

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med Harald Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure als mögliche
Ursache für falsch niedrig bestimmte Albuminwerte im Serum
mittels der Bromkresolpurpurmethode bei Hämodialysepatienten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sina Portz

aus Bergheim

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 20.07.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: PD Dr. med. Dr. rer. nat. Hans Günther Wahl, MBA

Korreferent: PD Dr. med. Uwe Kuhlmann

Inhaltsangabe

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Furansäuren	1
1.1.1 Vorkommen und Herkunft	1
1.1.2 Physiologie und Pathophysiologie	2
1.1.2.1 Physiologie	2
1.1.2.2 Pathophysiologie	3
1.1.2.2.1 Niereninsuffizienz und Hämodialyse	4
1.1.2.2.2 Diabetes	7
1.1.3 Nachweis/Analytik	8
1.2. Albumin	8
1.2.1 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung	8
1.2.2 Laborwert, klinische Relevanz	9
1.2.3 Messmethoden und Einflussfaktoren	10
1.3. Zielsetzung / Untersuchungen dieser Arbeit	13
2. <u>Material, Hilfsmittel, Geräte und Methoden</u>	15
2.1 Verwendete Materialien	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Lösungsmittel und Säuren	15
2.1.3 Gase	16
2.1.4 Standardverbindungen	16
2.1.5 Medikamente	17
2.2 Verwendete Hilfsmittel	18
2.2.1 Hilfsmittel zur Probenaufarbeitung	18
2.2.2 Hilfsmittel für die GC-MS-Analyse	18
2.3 Verwendete Geräte	19
2.3.1 Geräte zur Probenaufarbeitung	19
2.3.2 Analysegeräte	20
2.3.2.1 GC-MS	20

2.3.2.2 Albumin-Messgeräte	20
2.4 Verwendete Methoden	21
2.4.1 Herstellung von Diazomethan	21
2.4.2 Herstellung der Internen-Standard-Lösung	21
2.4.3 Gaschromatographie und Massenspektrometrie	22
2.4.3.1 Gaschromatographie	22
2.4.3.2 Massenspektrometrie	23
2.4.3.3 Quantitative Analyse	23
2.4.3.4 GC-MS-Einstellungen	24
2.4.4 Bestimmung von	
3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure	25
2.4.4.1 Aufarbeitung der Plasmaproben	25
2.4.4.2 GC-MS-Messung	26
2.4.4.2.1 Identifizierung der Substanzen mittels MS-Scan	26
2.4.4.2.2 Quantifizierung von	
3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure	28
2.4.4.3 Methodenetablierung und Validierung	29
2.4.4.3.1 Wiederfindung	30
2.4.4.3.2 Linearität	30
2.4.4.3.3 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	31
2.4.4.3.4 Bestimmung der Unpräzision	31
2.4.4.3.5 Bestimmung der Richtigkeit	32
2.4.5 Albuminbestimmung	32
2.4.5.1 Photometrische Bromkresolgrün (BCG) – Methode	32
2.4.5.2 Photometrische Bromkresolpurpur (BCP) – Methode	32
2.4.5.3 Immunologische Methode	33
2.4.6 Untersuchung des Einflusses von Medikamenten auf die	
Albuminbestimmung	33
2.5 Patienten	35
3. <u>Ergebnisse</u>	36

3.1 Albuminbestimmung	36
3.2 Quantifizierung von	
3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure im Plasma	42
3.2.1 Eichkurven	42
3.2.2 Wiederfindung	43
3.2.3 Statistische Qualitätskontrolle	43
3.2.3.1 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze	43
3.2.3.2 Unpräzision	44
3.2.3.3 Richtigkeit	44
3.2.4 Ergebnisse der Patientenproben	45
3.3 Untersuchung des Einflusses von Medikamenten auf die	
Albuminbestimmung	45
4. <u>Diskussion</u>	53
5. <u>Zusammenfassung</u>	64
5.1 Deutsche Zusammenfassung	64
5.2 Englische Zusammenfassung	66
6. <u>Anhang</u>	68
6.1 Abkürzungsverzeichnis	68
6.2 Abbildungsverzeichnis	70
6.3 Tabellenverzeichnis	72
6.4 Lebenslauf	73
6.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	75
6.6 Danksagung	77

6.7 Ehrenwörtliche Erklärung	77
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	79

1. Einleitung

1.1 **Furansäuren**

1.1.1 Vorkommen und Herkunft

1980 wurden durch Spiteller et. al [112] mit tetrasubstituierten Furansäuren im Urin eine neue Klasse von Stoffwechselprodukten gefunden [126]. Aufgrund ihrer Struktur und ihres Vorkommens im Harn wurden diese Substanzen "Urofuransäuren" genannt [88]. 3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropionsäure, 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (Abb.1) und weitere Begleitverbindungen wurden isoliert. Alle diese Verbindungen unterschieden sich nur im Aufbau der Alkylseitenkette in der Stellung 5 des Furanrings [88, 112]. 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (CMPF) und 3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropionsäure wurden 1980 von Pfordt et al. erstmals im menschlichen Blut nachgewiesen [87] und stellen die Hauptverbindungen [36] der Furansäuren im Blut und im Urin dar [88]. Bereits zu dieser Zeit erkannte man strukturelle Ähnlichkeiten der Furansäuren [88] mit den von Glass et al. 1974/75 im Fettgewebe von Leber und Testes gefundenen Furanfettsäuren (Abb.2) in Fischen [25, 26, 126].

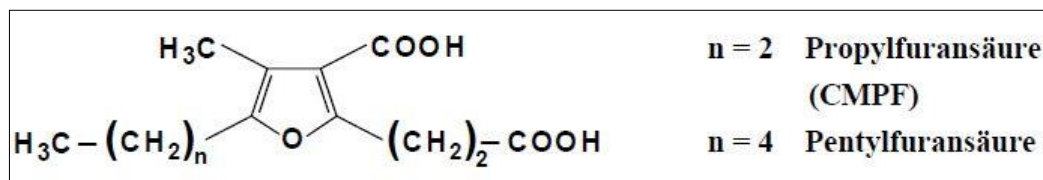


Abb.1 chemische Struktur von Propyl- und Pentylfuransäure [126]

Furanfettsäuren (Abb.2) waren früher bekannt und wurden schon 1966 im Keimöl von *Exocarpus cupressiformis* nachgewiesen [72]. In den darauf folgenden Jahren wurde eine große Vielzahl an Furanfettsäuren in verschiedensten Tierarten [2, 11, 25–28, 31, 41, 42, 83, 85, 100, 131], Pflanzen [4, 20, 34, 35, 99], Bakterien [93, 103], Nahrungsmitteln [32, 33, 128, 137], in den Phospholipiden im menschlichen Blut [92, 129] sowie in Erythrozyten und Thrombozyten [129] gefunden.

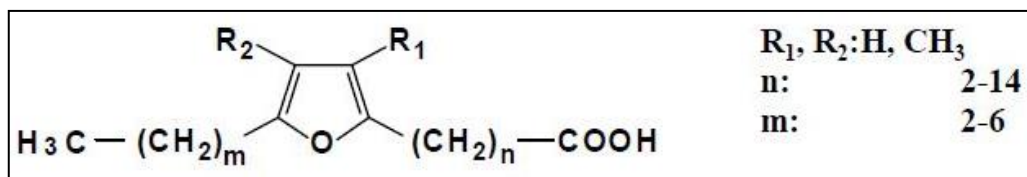


Abb.2 chemische Struktur von Furanfettsäuren [126]

Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich bei den Furansäuren um Metaboliten der durch die Nahrung aufgenommenen [27, 34, 138] Furanfettsäuren handelt [36, 101, 127]. Schödel et al. [101] beobachteten in einen Stoffwechselselbstversuch einen starken Anstieg der Pentylfuranensäurekonzentration im Urin nach Einnahme eines Pentylfuranfettsäuremethylesters [126]. Unter einer Nulldiät mit ungeschältem gekochtem Reis und Wasser kam es zu einer verminderten Ausscheidung der Furansäuren. Daraus zogen die Autoren den Schluss, dass Furanfettsäuren die Vorstufen der Furansäuren darstellen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Heindl et al., wo unter einer Nulldiät die Konzentration von CMPF im Urin deutlich abfiel, jedoch in geringen Mengen noch nachweisbar war und nach Nahrungsaufnahme wieder anstieg [36, 126]. Ebenso führte in einer klinischen Studie die Gabe von Fischölkapseln zu einem signifikanten Anstieg der CMPF-Konzentration im Serum und Urin [126, 127].

1.1.2 Physiologie und Pathophysiologie

1.1.2.1 **Physiologie**

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von CMPF-Konzentrationen von gesunden Personen im Blut publiziert [43, 58, 59, 66, 75, 78, 119, 120]. Hierbei fiel auf, dass es bei den Werten sehr große Unterschiede [138] gab und somit die Festlegung eines Referenzbereichs schwierig ist.

Für gesunde Personen aus 15 Studien wurden Werte zwischen 0,31 und 45,05 μM und ein mittlerer Wert von 14 μM angegeben. In einigen Fällen wurden in einem Labor bei Personen mit dem gleichen Gesundheitszustand große Unterschiede in den CMPF-Konzentrationen im Blut festgestellt. In 7 von 15 Studien betrug die Standardabweichung der CMPF-Werte von dem Mittelwert gleich 50 oder mehr Prozent [138].

Die Propylfuransäure bindet im Blut vorwiegend an die Bindungsstelle I des Albumins, wohingegen die Urämietoxine Indoxylsulfat, Hippursäure und Indol-3-essigsäure vorwiegend an die Bindungsstelle II des Albumins binden [95].

Das Ausscheidungsverhalten von CMPF weist ähnlich den Steroiden eine circadiane Rhythmik auf [18, 126]. Für die Pentylfuransäure konnte ein solches Verhalten nicht beobachtet werden [18, 126]. Bezüglich der Ausscheidung der Furansäure über die Niere wurden mehrere Studien durchgeführt [14, 37, 38, 82, 98].

So wird angenommen, dass CMPF in der Niere zunächst zum größten Teil mittels des Ionentransporters OAT3 an der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen aufgenommen [82] und anschließend über eine aktive Sekretion ausgeschieden wird [14, 37, 38, 82]. Die hohe Bindungsaffinität der Furansäuren zum Albumin weist auf eine aktive tubuläre Sekretion hin [37]. Eine weitere in vitro Studie konnte zeigen, dass CMPF und PAH sich gegenseitig bei ihrer Aufnahme in der Niere hemmen. Daraus zogen die Autoren den Schluss, dass CMPF ähnlich wie p- Aminohippursäure (PAH) über eine aktive tubuläre Sekretion in der Niere ausgeschieden wird und das Potential besitzt, die tubuläre Sekretion anderer Substanzen zu inhibieren [38, 126]. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Costigan et al., die eine in vivo Hemmung von PAH und Probenecid auf die Plasmaclarence von CMPF feststellten. Auch hier wurde eine aktive tubuläre Sekretion für CMPF angenommen und vermutet, dass CMPF zusätzlich noch andere organische Säuren hemmt [14]. Eine andere Studie von Sato et al. vertritt die These, dass das niedrige Clearance-Verhältnis zwischen CMPF und Kreatinin eher auf eine glomeruläre Filtration des nicht an Albumin gebundenen Anteils von CMPF im Blut hindeutet und keine aktive tubuläre Sekretion stattfindet [98].

1.1.2.2 Pathophysiologie

Bereits 1980 fielen Spiteller et al. Ähnlichkeiten der isolierten Urofuransäuren mit Prostaglandinen auf, weshalb man schon zu dieser Zeit die Vermutung von einer möglichen Wirkung der Furansäuren auf den menschlichen Organismus äußerte [112].

1.1.2.2.1 Niereninsuffizienz und Hämodialyse

Im Blut von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Hämodialyse wurden stark erhöhte Werte von CMPF nachgewiesen [15, 40, 43, 43, 55–59, 66, 75, 78, 97, 119]. Befand sich die chronische Niereninsuffizienz im Endstadium, so war der Mittelwert um das zehnfache höher als der Mittelwert in der Kontrollgruppe [40]. In einer anderen Studie waren die Werte ebenfalls um das zehn- bis zwanzigfache erhöht [58]. Allerdings unterlagen auch hier die in den letzten Jahren publizierten CMPF-Werte im Blut bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz einer großen Streubreite: Es wurden Werte zwischen 4,17 μM und 444,58 μM gemessen [138].

Aufgrund der hohen Albuminbindung mit pH-abhängigen [37] Bindungswerten von 98-100% [43, 56, 75, 78, 126] ist CMPF nur schwer mit den gängigen Dialyseverfahren aus dem Blut zu entfernen [7, 43, 44, 57, 58, 81, 108] und akkumuliert deshalb im Laufe der Zeit bzw. der Dialysebehandlung [37, 57, 75]. So dauert es ungefähr zwei bis vier Monate bis sich die CMPF-Werte nach einer Nierentransplantation normalisieren [56]. Andere Retentionssubstanzen wie Hippursäure sinken innerhalb weniger Tage nach der Transplantation in ihren Normbereich [56]. Dennoch gibt es mittlerweile einige wenige Dialyseverfahren, welche CMPF zumindest zu einem größeren Anteil aus dem Blut zu entfernen können. Durch eine Hämodialyse, deren Membranen noch für größere Proteine wie Albumin durchlässig ist, kann die CMPF-Konzentration gesenkt werden und einer Anämie vorbeugen [79, 82]. Auch mittels einer fortlaufenden ambulanten Peritonealdialyse können die Blutwerte von CMPF effektiv gesenkt und eine Anämie verbessert werden [76, 102].

Obwohl eine neuste Publikation CMPF als relevantes Urämietoxin in Frage stellt [63], vertreten viele andere Arbeiten die Meinung, dass es an der Ausprägung des urämischen Syndroms beteiligt ist [14] und zu den Urämietoxinen zählt [123].

2003 und 2008 veröffentlichte die European Toxin Group eine Liste von 90 Retentionssubstanzen, welche in drei Gruppen eingeteilt wurde: freie, wasserlösliche Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 500 Dalton, proteingebundene Substanzen und mittelgroße Substanzen mit einem Molekulargewicht größer 500 Dalton [120, 122]. Als Retentionssubstanzen werden

Stoffe bezeichnet, die im Blut akkumulieren [122]. Sind diese biologisch aktiv, zählen sie zu den Urämietoxinen [122]. CMPF zählt laut diesen Publikationen zu den proteingebunden Retentionssubstanzen, von denen einige toxische Eigenschaften besitzen [120, 122]. Urämietoxine haben Auswirkungen auf viele Organsysteme und führen im Rahmen der Urämie zu den unterschiedlichsten Symptomen, bzw. Krankheitsbildern [123].

Auch CMPF wird mit verschiedenen Aspekten des urämischen Syndroms in Verbindung gebracht [14]. So soll CMPF am Bindungsdefekt von Albumin [37, 75, 96, 114, 118, 126], an der Inhibition der aktiven tubulären Sekretion anderer harnpflichtiger Substanzen [38], an der Entstehung einer Anämie [17, 76] und an der Auslösung neurologischer Symptome [16] beteiligt sein [14].

CMPF besitzt unter allen Urämietoxinen die größte Bindungskonstante zu Albumin [95] und ist in der Lage verschiedenste Substanzen aus ihrer Albuminbindung zu verdrängen [37, 75, 96, 114, 118].

3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure führt zur Verdrängung von Phenytoin [64, 75], Furosemid [114], Tryptophan [64] und Salicylsäure [75]. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Propylfuransäure nicht nur wie oben genannt die Bindung verschiedenster Medikamente an das Serumalbumin hemmt, sondern auch deren Aufnahme und Metabolismus bzw. Entgiftung beeinflussen kann [68, 113, 117]. So kann CMPF signifikant die hepatischen Aufnahmetransporter für Erythromycin in der Leber und in höheren Konzentrationen deren Metabolismus hemmen [113]. Ähnliche Beobachtungen machten auch Tsujimoto et al., die eine Hemmung der Digoxin-Aufnahme in der Leber durch CMPF feststellten [117]. Darüber hinaus soll CMPF die Phase I und II der Biotransformation in der Leber im Rahmen der Entgiftung inhibieren [113]. Auch eine in vitro Inhibierung der hepatischen Glutathion-S-Transferase-Aktivität durch CMPF konnte nachgewiesen werden [68]. Außerdem trägt CMPF wahrscheinlich zur Herabsetzung der Bindungskapazität von Bilirubin an das Albumin bei [119], indem es kompetitiv die Bindung des Bilirubins inhibiert [118].

Eine weitere Folge der hohen Bindungskapazität von Albumin sind womöglich erniedrigte Serum-Trijodthyroninspiegel bei urämischen Patienten [59, 60]. Durch die Verdrängung anderer Substanzen aus ihrer Albuminbindung wird die Fraktion

der freien, sich um die an thyroxinbindende Globulin konkurrierenden Substanzen erhöht [60]. Diese konkurrieren dann mit Tetrajodthyronin und führen so wahrscheinlich zu den erniedrigten Serum-Trijodthyroninspiegeln bei urämischen Patienten [60]. Lim et al. [59] konnten nachweisen, dass CMPF einer der stärksten Inhibitoren des Tetrajodthyronin-Transportes in die Leberzellen und der anschließenden Dejodierung ist. In einer anderen Studie zeigte sich, dass CMPF keinen Einfluss auf die Wiederaufnahme von Trijodthyronin und Tetrajodthyronin im Hypophysenvorderlappen hat [21]. Es scheint sich hier um einen anderen Regulationsmechanismus zur Aufnahme der freien Schilddrüsenhormone als der in Hepatozyten zu handeln. Das Ausbleiben eines Anstiegs von TSH bei urämischen Patienten konnte somit nicht abschließend geklärt werden [21].

Für die Propylfuransäure konnte in in vitro Experimenten eine Hemmung der Erythropoese nachgewiesen werden [76]. Eine andere Studie von Costigan et al. [17] beobachtete eine negative Korrelation zwischen der CMPF-Konzentration im Plasma und der Hämoglobin-Konzentration bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Daraus zogen die Autoren den Schluss, dass CMPF möglicherweise einen Einfluss auf die Entstehung einer Anämie hat [17].

Darüber hinaus kann CMPF eine direkte Schädigung der Zellen hervorrufen [43, 71, 77]. Die Propylfuransäure ist möglicherweise ein Prooxidant, welcher über eine nachfolgende Überproduktion von Sauerstoffradikalen einen Zellschaden in den proximalen Tubuluszellen verursacht [71]. Es konnte außerdem in in vitro Experimenten gezeigt werden, dass CMPF in Anwesenheit von Albumin die endotheliale ROS-Produktion in menschlichen Nabelvenenendothelzellen induziert [43]. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass CMPF auch den Energiestoffwechsel von Zellen negativ beeinflusst, indem es die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien hemmt [77]. Dabei entsprach die Hemmdosis in etwa dem Serumlevel von CMPF bei Patienten unter Hämodialyse [77].

Außerdem gibt es Grund zur Annahme, dass CMPF im Zusammenhang mit neurologischen Symptomen im Rahmen der Urämie steht [16]. Aufgrund der Beobachtung, dass CMPF den Transport von organischen Säuren in der Niere hemmt, zogen die Autoren den Schluss, dass der gleiche Mechanismus auch an der

Blut-Hirnschranke stattfinden und zu neurologischen Störungen führen könnte [16].

Obwohl bekannt ist, dass proteingebundene Urämietoxine das kardiovaskuläre System negativ beeinflussen können [121], wurde dies nicht für die Propylfuransäure nachgewiesen [63, 121]. Laut einer Studie von Luce et al. von 2018 [63] ist das akkumulierte CMPF bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Hämodialyse nicht mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und erhöhter Mortalität assoziiert.

1.1.2.2.2 Diabetes

Es wurden ebenfalls erhöhte CMPF-Konzentrationen im Blut von Patienten mit Gestationsdiabetes [90, 139] und Diabetes mellitus Typ 2 gefunden [61, 90, 140]. Forscher fanden heraus, dass CMPF in Mäusen eine Glukoseintoleranz induziert, zu einer Verschlechterung der Glukosestimulierung und einer Verminderung der Glukoseverwertung durch Hemmung der Insulinsekretion führt [61, 74, 90]. Es konnte eine direkte Einwirkung von CMPF auf die Beta-Zellen des Pankreas gezeigt werden: Durch eine Verschlechterung der Mitochondrienfunktion, verminderte Glukose induzierte ATP Akkumulation und induzierten oxidativen Stress kommt es zu einer Dysregulation von den für die Insulinbiosynthese entscheidenden Transkriptionsfaktoren [90]. Aufgrund dieser Beobachtungen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass CMPF in erhöhten Konzentrationen eine Entwicklung eines Diabetes beschleunigen bzw. fördern kann [61, 139] oder auf einen gestörten Glukosestoffwechsel hinweist [140].

In einer anderen Studie konnte kein schädlicher Einfluss durch moderat erhöhte CMPF-Konzentrationen, welche durch einen erhöhten Fischkonsum hervorgerufen wurden, auf den Glukosemetabolismus bei Patienten mit Merkmalen eines metabolischen Syndroms nachgewiesen werden [53]. Eine neuste Studie von Prentice et al. [91] aus dem Jahr 2018 konnte zeigen, dass CMPF durch Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase und Induktion von FGF21 (fibroblast growth factor) positive Effekte auf die Prävention und Umkehr der Insulinresistenz und eine Steatosis hepatis besitzt.

1.1.3 Nachweis/Analytik

Für die Analytik der Furansäuren werden eine Vielzahl von Methoden eingesetzt: HPLC mit UV-Detektion [59, 64–66, 71, 75, 78, 79, 108, 114, 119], GC [56, 100], MS [80], GC-MS [36, 55, 57, 58, 75, 125–127, 129], LC-MS [98], LC-MS-MS [40, 44] und ELISA [115]. Die am häufigsten verwendete Methode ist die GC-MS-Methode, gefolgt von der HPLC-/LC-MS und der neueren ELISA-Methode.

1.2. **Albumin**

1.2.1 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung

Humanes Albumin ist eines der wichtigsten in der Leber synthetisierten Serumproteine [19, 39, 94] und macht 50 % ihrer Gesamtheit aus [8, 19]. Im Vergleich zu anderen Serumproteinen ist Albumin ein kleines Molekül, welches aus einem Polypeptid mit 585 Aminosäuren besteht [19, 51], eine molekulare Masse von 66,5 Dalton [8] hat und eine lange Halbwertszeit im Blut von 20 Tagen [39] aufweist. Die Konzentration von Albumin im Blut ist ein wichtiger und prognostischer Marker für Gesundheit und Krankheit [19, 94].

Albumin besitzt sowohl einen Plasma- als auch einen extravaskulären Pool [94]. Bei Gesunden befinden sich 30 bis 40 % des gesamten Albuminpools im Blut [19], welches bei Erwachsenen einer Konzentration von circa 35-55 g/l entspricht [48]. Eine Balance zwischen Synthese, Verteilung und Abbau des Albumins hält einen konstanten Blutspiegel aufrecht [94]. In der Albuminsynthese ist eine adäquate Ernährung der wichtigste Regulationsfaktor [94]. Die Verteilung des Albumins zwischen dem Plasma- und dem extravaskulären Pool ist von dem Konzentrationsgefälle zwischen diesen beiden Räumen abhängig. Bei einem Proteinverlust des Körpers und somit bei einer niedrigeren Serumkonzentration strömt Flüssigkeit aus dem Plasma in den extravaskulären Raum [94]. Die Regulationsfaktoren des Albuminabbaus bei Gesunden ist bislang unbekannt, wohingegen bei einer Erkrankung sowohl der Magen-Darm-Trakt, als auch die Nieren beim Abbau eine wichtige Rolle zu spielen scheinen [94].

Die Beobachtung, dass eine Hyperalbuminämie selbst bei einer akuten Dehydratation nicht auftritt, lässt laut Rothschild et al. [94] darauf schließen, dass effektive Kontrollmechanismen des Körpers existieren, um einen starken

Albuminanstieg im Blut zu verhindern. Dahingegen scheint die Kontrolle über niedrige Albuminspiegel im Blut, wie sie bei Erkrankungen wie Nephrose, Mangelernährung, Zirrhose, verschiedenen malignen Erkrankungen oder bei schweren Stesszuständen vorkommen, weniger effektiv zu sein [94].

Albumin ist ein wichtiges Serumprotein, welches physiologische und pharmakologische Substanzen bindet und für dessen Transport im Körper verantwortlich ist [39]. Eine Veränderung der Albuminkonzentration oder eine Niereninsuffizienz können diese Bindungseigenschaft erheblich stören: Tritt eine Hypoalbuminämie auf, wird die Fraktion der frei gelösten Substanzen höher, welches unter anderem einen erheblichen Einfluss auf den Metabolismus von Medikamenten hat [39]. Dies hat zur Folge, dass im Falle eines Albuminmangels die Dosierung einiger Medikamente angepasst werden muss. Bei chronischer Niereninsuffizienz nimmt die Bindungsaffinität des Albumins für andere gelöste Stoffe wie Medikamente oder Farbstoffe ab, was ebenfalls zum Anstieg der frei gelösten Fraktion dieser Substanzen führt [39].

Durch seine hohen colloidalen Eigenschaften ist Albumin entscheidend an der Verteilung von Flüssigkeiten im Körper beteiligt [19] und trägt rund 67-75 % des normalen onkotischen Drucks bei [134]. Darüber hinaus spielt Albumin aufgrund seines Aufbaus und seiner chemischen Eigenschaften eine wichtige Rolle im Säure-Base-Haushalt [19].

1.2.2 Laborwert, klinische Relevanz

Albumin ist ein wichtiger und oft bestimmter Laborwert in der Medizin, welcher ein Marker für Erkrankungen der Niere [3, 94], den Ernährungsstatus [3, 13], die Leberfunktion [3, 94], das Flüssigkeitsgleichgewicht [3] und verschiedene Darmerkrankungen [94] darstellt. Es gehört außerdem zu den Negativ Akute Phase Proteinen und ist somit bei Entzündungen im Blut erniedrigt [30].

Von besonderer klinischer Relevanz ist die Hypoalbuminämie, welche als Albuminkonzentration im Blut unter 40 g/l [8] charakterisiert ist. Sie tritt bei vielen verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel Leberzirrhose [94], nephrotischem Syndrom [94], Niereninsuffizienz [47], Mangelernährung [94], verschiedenen

Darmerkrankungen [6, 45, 94], Infektionen und starken Verbrennungen [94] sowie malignen Erkrankungen [94] auf.

Vor allem bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Hämodialyse ist Albumin ein Marker für Morbidität und Mortalität [12, 13, 62, 84]. Albumin besitzt insofern eine prognostische Aussagekraft, als eine Hypoalbuminämie durch unterschiedliche pathophysiologischen Prozesse verursacht werden kann [47].

Zu diesen Prozessen [47] gehören zum einen eine verminderte Albuminsynthese durch Mangelernährung [49] oder Entzündungen [73], zum anderen ein erhöhter Albuminverlust bei regulärer Synthese durch Proteinurie [46] im Rahmen eines nephrotischen Syndroms oder einer Hämodialyse [23, 116]. Ein weiterer Grund für eine Hypoalbuminämie ist die Umverteilung des Albumins vom vaskulären in den extravaskulären Raum im Rahmen eines Traumas oder einer Sepsis [47]. Laut Kaysen et al. [47] ist eine reduzierte Albuminsynthese der Hauptgrund für erniedrigte Albuminwerte im Blut bei Hämodialysepatienten.

Albumin wird jedoch nicht nur als prognostischer Marker eingesetzt, sondern gilt auch als Marker für die Qualität bzw. Güte der Versorgung von Hämodialysepatienten in Dialyseeinrichtungen [3, 12, 29]. Aus diesem Grund wird die Albuminkonzentration regelmäßig überwacht und im ambulanten Bereich den zuständigen Kassenärztlichen Vereinigungen mitgeteilt. Laut den Leitlinien-Empfehlungen der National Kidney Foundation soll eine Albuminkonzentration bei Hämodialysepatienten im Serum von mindestens 4,0 g/dl erreicht werden [13].

1.2.3 Messmethoden und Einflussfaktoren

Die hohe klinische Relevanz des Albumins in verschiedenen Bereichen der Medizin macht eine zuverlässige Bestimmung im Labor notwendig.

Für die quantitative Bestimmung im Serum bzw. Plasma stehen heute zwei verschiedene chromogene und immunologische Methoden zur Verfügung [39]. Die immunologischen Methoden wie die Immunonephelometrie und die Immunturbidimetrie [39] zählen zum Goldstandard, da sie sich durch eine hohe Präzision mit geringer Störanfälligkeit auszeichnen [29, 39, 107]. Allerdings werden sie meist nicht in der Routinediagnostik eingesetzt, da sie relativ teuer sind

und an den üblichen klinisch-chemischen Analysegeräten nicht durchgeführt werden können [10, 39].

Die am häufigsten verwendete Methode ist der Albuminnachweis mittels der Farbstoffe Bromkresolgrün (BCG) (Abb.3) und Bromkresolpurpur (BCP) (Abb.4) [39].

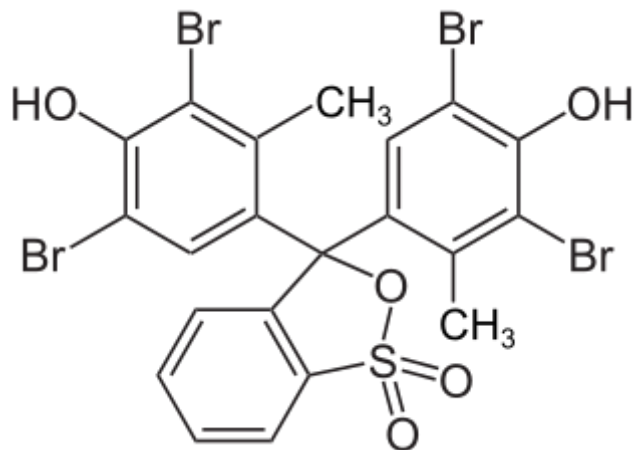


Abb.3 Bromkresolgrün

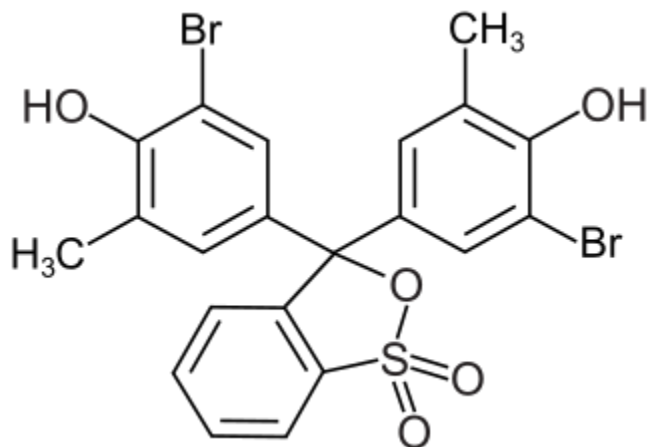


Abb.4 Bromkresolpurpur

Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie finanziell günstig, präzise und schnell durchführbar ist sowie auf allen üblichen klinisch-chemischen Analysegeräten durchgeführt werden kann [39, 89].

Allerdings hat die Auswahl der Bestimmungsmethode einen deutlichen Einfluss auf die Ergebnisse, insbesondere bei Patienten unter Hämodialyse [3, 10]. In vielen Studien wurde darauf hingewiesen, dass es bei den unterschiedlichen Methoden teilweise zu starken Unterschieden zwischen den angegebenen Albuminwerten kam [3, 10, 22, 39, 67, 69, 89, 107, 111, 130, 133, 136]. So stellten Carfrey et al. [10] im Jahr 2000 in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode einen Unterschied von bis zu 1g/dl fest.

Mehrere Studien beobachteten bei der BCG-Methode eine Überschätzung der Albuminwerte [3, 22, 89, 133], insbesondere bei niedrigeren Albuminlevels [111, 133], Hämodialysepatienten, [10, 136], Patienten mit nephrotischem Syndrom [111] oder erhöhten Akute-Phase-Proteinen [39]. Es zeigte sich außerdem eine schlechte Korrelation zwischen den von der BCG-Methode bestimmten Albuminwerten und den immunologischen Vergleichsmethoden bei Patienten mit Nephrose oder Leberzirrhose [107]. Als mögliche Ursache für falsch hoch gemessene Albuminwerte gelten eine niedrige Spezifität des Farbstoffs BCG für die Albuminbildung [22] oder eine Interaktion des Farbstoffs mit Alpha- und Beta-Globulinen, wenn diese durch Erkrankungen wie zum Beispiel dem nephrotischem Syndrom erhöht sind [132, 133]. Eine Unterschätzung des Albuminwertes wurde dahingegen bei hohen Serumlevels festgestellt [133]. Eine andere Studie beobachtete eine Absenkung des durch BCG bestimmten Albuminwertes bei Patienten mit Urämie [9]. Darüber hinaus konnten für die BCG-Methode falsch niedrig gemessenen Albuminwertes in heparinisiertem Plasma festgestellt werden [5, 86]. Aus diesen Gründen sollte überlegt werden, die BCG-Methode nur als Screeningmethode zu betrachten [132, 133].

Im Vergleich zu der BCG-Methode wurden für die BCP-Methode ein niedrigerer Bias [3] und eine bessere Korrelation mit immunologischen Methoden [10] bei Proben von Hämodialysepatienten festgestellt. Darüber hinaus wurden weniger Interaktionen mit Globulinen und Transferrin beobachtet [89]. Dennoch wurde in einigen Studien eine Unterschätzung des Albuminwertes mittels der BCP-Methode insbesondere bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Hämodialyse festgestellt [3, 67, 69, 136].

Als mögliche Ursachen für die falsch niedrig gemessenen Albuminwerte mittels der BCP-Methode bei Hämodialysepatienten gelten 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure [67, 130], andere Retentionssubstanzen mit hoher Albuminbindung [69, 136] bei gleichzeitig niedriger Bindungsaffinität von BCP an das Albumin [69] und eine Carbamylierung des Albumins [50, 130].

Da eine generelle Albuminbestimmung mittels immunologischer Methoden im Bereich der Dialyse jedoch als finanziell nicht durchführbar erscheint, empfehlen die beiden Autoren Bachmann et al. [3] und Carfray et al. [10] weiterhin die Messung mit einer vereinheitlichten BCP-Methode.

1.3 Zielsetzung / Untersuchungen dieser Arbeit

Eine firmenbedingte Umstellung der Albuminbestimmung (Siemens Healthineers, Deutschland) von der BCG zu der BCP Methode führte in 2016 wie erwartet zu verbesserten Ergebnissen der Albuminbestimmung in den meisten Fällen. Es gab jedoch bei einigen Hämodialysepatienten niedrigere Werte von bis zu 7 g/l. Weitere Messungen bestätigten diese ersten Ergebnisse, so dass wieder auf die alte BCG Methode umgestellt wurde. Bevor die Empfehlung für eine harmonisierte BCP-basierte Albuminbestimmung [3, 10] auch für Hämodialysepatienten umgesetzt werden kann, müssen die abweichenden Messwerte abgeklärt werden.

Mit Hilfe dieser Studie soll zum einen das Ausmaß des negativen Bias der Albuminwerte durch die BCP-Methode quantifiziert werden, zum anderen soll die Furansäure 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (CMPF) als möglicherweise entscheidender Einflussfaktor auf chromogene Albuminbestimmungsmethoden untersucht werden. Darüber hinaus soll ein Einfluss weiterer möglicher Störsubstanzen auf chromogene Albuminbestimmungsproben wie Medikamente mit hoher Bindungsaffinität zu Albumin ausgeschlossen werden.

Ziel ist es zum einen, die Anwendbarkeit der neuen BCP-Methode bei Hämodialysepatienten zu prüfen und eine Aussage über den Einfluss der Furansäure CMPF auf chromogene Albuminbestimmungsmethoden zu treffen.

Dafür soll zunächst die von H.G. Wahl [125] eingesetzte GC-MS-Methode zur Quantifizierung der vermuteten Störsubstanz CMPF optimiert werden mit dem Ziel, möglichst geringe Volumina einzusetzen. Im Anschluss soll die Albuminbestimmung in der Gruppe von Dialysepatienten (n=124) und einer nicht-dialysepflichtigen Kontrollgruppe (n=101) mittels zwei chromogener und einer nephelometrischen Methode durchgeführt werden. Danach erfolgt der Methodenvergleich zwischen den einzelnen Messmethoden und den beiden Gruppen. Zum anderen soll in verschiedenen Experimenten der Einfluss verschiedener möglicher Störfaktoren wie 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure und Medikamente mit einer hohen Bindungsaffinität zu Albumin auf die Albuminbestimmung mittels chromogener Methoden untersucht werden.

2. Material, Hilfsmittel, Geräte und Methoden

2.1 **Verwendete Materialien**

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und alle Lösungsmittel von LCMS-Qualität.

Name	Hersteller
Wasser	VWR Chemicals International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
<i>N</i> -Nitrosomethylharnstoff	JenaBios GmbH, Jena, Deutschland
Diethylether (>99%)	Honeywell Fluka, Seelze, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)-Plätzchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
isotone Natriumchloridlösung (NaCl 0,9%)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumkarbonat	Riedl-de-Haen über Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

Tab.1 verwendete Chemikalien

2.1.2 Lösungsmittel und Säuren

Name	Hersteller/Herstellung
Methanol	Honeywell Specialty Chemicals, Seelze, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure (> 98%)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab.2 verwendete Lösungsmittel und Säuren

2.1.3 Gase

Name	Hersteller	Reinheitsgrad	Reinheit (in %)
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf, Deutschland	5,0	99,9990
Helium	Linde AG, Düsseldorf, Deutschland	5,0	99,9990

Tab.3 verwendete Gase

2.1.4 Standardverbindungen

Name	Hersteller, Quelle
4-Acetyl-3,5-dimethyl-2-pyrrolcarboxylsäure 95%, interner Standard (ISTD)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure	Die 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure wurde von Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. Hans Günther Wahl, Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

Tab.4 verwendete Standardverbindungen

2.1.5 Medikamente

Name	Typ	Hersteller
S-Naproxen	NSAID	Cayman chemical, Michigan, USA
Lasix Injektionslösung, Furosemid	Diuretikum	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt, Deutschland
DL-Tryptophan	Antidepressivum	La Roche AG, Grenzach, Deutschland
Chloramphenicol	Antibiotikum	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
L-Thyroxin	Hormon	Henning Arzneimittel GmbH, Berlin, Deutschland Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Phenprocoumon	Antikoagulanz	Acis Arzneimittel GmbH, Grünwald, Deutschland

Tab.5 verwendete Medikamente

2.2 Verwendete Hilfsmittel

2.2.1 Hilfsmittel zur Probenaufarbeitung

Name	Eigenschaften	Hersteller
Reaktionsgefäße 3810X	1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sorenson Multi Dolphin Tube	2,0 ml	Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland
Reagenzgläser	Durchmesser: 12mm, Länge: 75mm, Volumen: 6ml	Fa. Scherf-Präzision Europa GmbH, Meiningen, Deutschland
Pasteur Pipetten		Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
C18-SPE-Kartuschen Strata-X 33µm, Polymeric Sorbent	60 mg Sorbent Sorbent	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland

Tab.6 verwendete Hilfsmittel zur Probenaufarbeitung

2.2.2 Hilfsmittel für die GC-MS-Analyse

Name	Eigenschaften	Hersteller
Short Thread Vial		Fa. BGB Analytik Vertrieb GmbH Rheinfelden, Deutschland

Short Thread Screw Caps, ND9		Fa. BGB Analytik Vertrieb GmbH Rheinfelden, Deutschland
Conical Glas Inserts	250 µl	Fa. BGB Analytik Vertrieb GmbH Rheinfelden, Deutschland
GC-Säule	HP-5ms, 30 m, 0,25 mm x 0,25 µm	J+W Scientific (Agilent), Santa Clara, USA

Tab.7 verwendete Hilfsmittel für die GC-MS-Analyse

2.3 Verwendete Geräte

2.3.1 Geräte zur Probenaufarbeitung

Name	Hersteller	Beschreibung
Varian Vactech	Varian, Darmstadt, Deutschland	Arbeitsstation für die Festphasenextraktion mit 20 Stellplätzen
Merck LiChrolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Arbeitsstation für die Festphasenextraktion mit 12 Stellplätzen
Hermle Zentrifuge Z 323 K	Hermle Labortechnik GmbH Wehingen, Deutschland	
Heraeus Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Hanau, Deutschland	

IKA Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland	
Pierce Reacti Therm - Vap III	Pierce Oud-Beijerland, Niederlande	Abdampfstation mit 27 Stellplätzen
Waage ABT 120-5DNM	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland	

Tab.8 verwendete Geräte zur Probenaufarbeitung

2.3.2 Analysegeräte

2.3.2.1 GC-MS

Name	Hersteller
GC mit Autosampler, Agilent 7890A	Agilent, Waldbronn, Deutschland
MS, Agilent MS 5975C,	Agilent, Waldbronn, Deutschland

Tab.9 verwendetes GC-MS

2.3.2.2 Albumin-Messgeräte

Name	Hersteller
Siemens Advia 1800	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland
BN ProSpec	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland

Tab.10 verwendete Albumin-Messgeräte

2.4 Verwendete Methoden

2.4.1 Herstellung von Diazomethan [1]

Warnhinweise:

Die Herstellung von Diazomethan ist unter dem Abzug und unter Einhaltung allgemeiner Schutzmaßnahmen (Tragen einer Schutzbrille und Handschuhen) durchzuführen. Außerdem besteht bei der Herstellung Explosionsgefahr, weshalb UV-Licht, scharfe Kanten und raue Oberflächen zu vermeiden sind und das verwendete Reagenzglas in ein Eisbad gestellt werden muss.

Sowohl *N*-Nitrosomethylharnstoff als auch Diazomethan gelten als giftige und kanzerogene Gefahrenstoffe.

Herstellung:

- ein schliffloses 50 ml Reagenzglas in ein Eisbad stellen
- 1 ml Wasser vorlegen (kühlen)
- 0,5 g *N*-Nitrosomethylharnstoff zugeben
- 40 ml Diethylether zugeben (kühlen)
- 4 ml 40%iges KOH vorsichtig zugeben und 1-2 Stunden stehen lassen
- die mit CH_2N_2 gesättigte etherische Phase (gelb) in ein trockenes, gut verschließbares Aufbewahrungsgefäß geben und über KOH-Plättchen bei -20°C aufbewahren (ausreichend für ca. 130 Proben)

2.4.2 Herstellung der Internen-Standard-Lösung

Es wurde eine Stammlösung aus dem internen Standard 4-Acetyl-3,5-dimethyl-2-pyrrolcarboxylsäure und Methanol in der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Hieraus wurde dann die Arbeitsverdünnung mit einer Konzentration von 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ durch Verdünnung mit MeOH hergestellt.

2.4.3 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

2.4.3.1 Gaschromatographie

Eine Analyse mittels Gaschromatographie (GC) wird in folgenden, kontinuierlich nacheinander ablaufenden Teilschritten durchgeführt: Eine verdampfbare Flüssigkeit wird auf eine Trennsäule mittels eines Injektors aufgegeben. Von dort werden die Substanzen mit Hilfe des Trägergases durch eine Säule transportiert, wo der chromatographische Trennvorgang stattfindet. Die getrennten Substanzen passieren dann nacheinander am Säulenende einen Detektor, der jeden einzelnen Bestandteil detektiert und über einen Schreiber oder einen Computer anzeigt. Die Zeit zwischen Injektion der Probe und Signal am Detektor heißt Retentionszeit (RT). Voraussetzung für den Einsatz der GC ist, dass die zu untersuchenden Proben vollständig und unzersetzt in den Gaszustand überführt werden können.

Entsprechend dem Trennproblem kann die Füllung (stationäre Phase) der Trennsäule aus einem festen Adsorptionsmaterial oder aus einem Material bestehen, bei dem auf einem festen, inerten Träger eine flüssige Trennphase aufgebracht ist. Kapillarsäulen weisen Innendurchmesser von 0.1 bis 1 mm und Längen von 30 bis 50 m und mehr auf. Zu den Vorteilen der Kapillargaschromatographie zählen die ausgezeichnete Auftrennung sehr komplexer Gemische und chemisch sehr ähnlicher Verbindungen, die relativ große Sicherheit bei der Peakidentifizierung, die erhöhte Empfindlichkeit und hohe Trennleistung sowie die Möglichkeit der Kopplung mit spektroskopischen Methoden.

Der Erfolg einer gaschromatographischen Trennung ist im Wesentlichen abhängig von der richtigen Wahl der Trennmedien. Darüber hinaus kann das Ergebnis der Trennung aber auch durch die Wahl einer geeigneten Temperatur bzw. eines Temperaturprogramms optimiert werden. Nichtflüchtige oder unzersetzliche Verbindungen können durch chemische Umsetzungen in flüchtige stabile, für die GC geeignete Derivate wie zum Beispiel Methylester im Fall organischer Säuren überführt werden.

2.4.3.2 Massenspektrometer

Bei der Massenspektroskopie (MS) werden die in der Ionenquelle des Massenspektrometers entstehenden Molekülionen bzw. deren Fragmente zur Strukturaufklärung von Stoffen herangezogen. Voraussetzung für ihre Anwendbarkeit ist, dass die Probensubstanz im Vakuum ohne Zersetzung den zur Aufnahme des Spektrums erforderlichen Dampfdruck erreicht. In einer Ionisierungskammer werden die gasförmigen Moleküle dann mit Elektronen bombardiert, die gewöhnlich eine Energie von ca. 70 eV besitzen. Diese Energie reicht nicht nur aus, um die Moleküle durch Herausschlagen eines Elektrons zu ionisieren, sondern darüber hinaus die entstandenen positiven Ionen weiter zu fragmentieren. In Abhängigkeit von der Molekülstruktur entstehen so charakteristische Bruchstücke, die entsprechend ihrem Verhältnis Masse/Ladung (m/z) in einem Analysator (magnetisches und / oder elektrisches Feld) aufgetrennt (Massenfokussierung) und schließlich einem Detektor zugeführt werden. Die Gesamtheit der Signale ergibt das Massenspektrum. Die Lage des Signals (Peak) entspricht dem Verhältnis Masse/Ladung (m/z -Wert), die Intensität der Häufigkeit des jeweiligen Ions. Der m/z -Wert gibt zum einen Auskunft über die relative Molekülmasse. Zum anderen lassen sich aus ihm die Strukturen der geladenen Bruchstücke ableiten, die ihrerseits wiederum zur Struktur des intakten Moleküls in Beziehung stehen. Aufgrund seiner schnellen Ansprechzeit und seiner Aussagekraft hinsichtlich Molmasse und Molekülstruktur ist das MS besonders gut zur Kombination mit GC-Säulen geeignet.

2.4.3.3 Quantitative Analyse

Die GC-MS wird vielfach zur quantitativen Analyse von Flüssigkeits- und Gasmischungen eingesetzt. Die Fläche unter einem Peak (area under the curve =AUC) ist der Konzentration der entsprechenden Komponente in der Mischung proportional. Aus diesem Grund liefert die Auftragung der Peakfläche gegen die Konzentration von Kalibrierstandards eine Kalibriergerade für die quantitative Analyse. Die quantitative Analyse beruht auf der Proportionalität zwischen der

Fläche des Peaks, der von einer Komponente hervorgerufen wird, und der Gesamtmenge der jeweiligen Komponente in der Probe.

Wenn systematische Fehler während der Probenvorbereitung zu erwarten sind, wird die Anwendung eines internen Standards notwendig. Der interne Standard ist eine dem Analyten chemisch ähnliche Substanz, die in den zu untersuchenden Proben nicht vorkommt. Sie wird in bekannter Konzentration zu jeder Probe und jedem Standard hinzugefügt und dient somit als relative Bezugsgröße. Wenn der interne Standard seine Konzentration verändert hat, wird angenommen, dass sich die Konzentration des Analyten in gleicher Weise verändert hat. Daher ist die Wahl der Substanz für den internen Standard von ganz entscheidender Bedeutung. Voraussetzung für die Verwendung von internen Standards ist eine Analysenmethode, mit der simultan der interne Standard und der Analyt bestimmt werden kann. Die Kalibrierfunktion wird aus den Signalen der Messungen von einer oder mehreren Standardlösungen bekannter Konzentration (Eichkurven) erhalten. Das Verhältnis der relativen Intensität eines Analytsignals zu dem Signal des internen Standards dient als analytischer Parameter. Zur Kalibrierung wird somit das Signalverhältnis Analyt/interner Standard verwendet.

Im Falle einer GC-MS Analyse im Selected Ion Monitoring (SIM) Modus werden hierzu üblicherweise die Ionen mit der höchsten Intensität (base peak) der jeweiligen Substanzen eingesetzt.

2.4.3.4 GC-MS-Einstellungen

GC-Einstellungen

Vordruck:	12,2 PSI
Injektion:	1µl; splitless
Injektion-Temperatur:	280°C
Transferline:	300°C
Temperaturprogramm:	Starttemperatur: 130°C für 5 Minuten Gradient 4°C/Minute bis 200°C Gradient 15°C/Minute bis 300°C
Laufzeit:	34,2 Minuten

MS-Einstellungen

Ion source:	EI (Elektronenstoßionisation)
Source temperature (°C):	230
Quad temperature (°C):	150
Fixed Electron energy (eV):	2
Aquisition Type:	SIM (Selected Ion Monitoring)
CMPF:	m/z 179 (Quantifier)
	m/z 208 m/z, m/z 268 (Qualifier)
IS:	m/z 148 (Quantifier)
	m/z 195 (Qualifier)
Solvent delay (Minuten):	12

2.4.4 Bestimmung von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure

2.4.4.1 Aufarbeitung der Plasmaproben

Diese Methode wurde in Anlehnung an die Methode von H. G. Wahl [125] weiterentwickelt und optimiert.

Die Aufarbeitung der Plasmaproben setzt sich aus folgenden Teilschritten zusammen:

1) Probenvorbereitung:

100 µl Plasma in ein 1,5 ml Cup pipettieren, genau 10 µl ISTD-Lösung (100 ng/µl) hinzufügen und die Probe auf einem Vortexer gut vermischen.

2) Proteinpräzipitation:

100 µl Methanol (100%) zugeben. Proben gut mischen und für 30 Minuten bei 8°C kühlen und anschließend bei 10400g für 10 Minuten zentrifugieren.

3) Verdünnungsschritt:

Den Überstand abnehmen und in ein 2 ml Cup geben und mit 1600 µl 0,01 molarer Ameisensäure verdünnen.

4) SPE-Konditionierung:

Die C18-SPE-Kartuschen (Strata X33) mit 1000 µl Methanol und 1000 µl Wasser konditionieren.

5) Probenaufgabe:

Die verdünnten Proben auf die C-18-Festphasenkartusche aufgeben und mittels Schwerkraft, ohne Anlegen von Vakuum durch die Säulen laufen lassen.

6) Waschen und Trocknen:

Die Kartuschen mit 1000 µl 5%igem Methanol waschen (Schwerkraft, ohne Vakuum). Für 45 Minuten Luft - zum Trocknen - durch die Kartuschen ziehen.

7) Elution:

Mit 1000 µl Methanol eluieren (Schwerkraft ohne Vakuum) und am Ende mittels Pumpe den Rest Methanol durchziehen.

8) Methylierung: (unter dem Abzug arbeiten!)

Zu dem Eluat werden portionsweise ca. 200-400 µl Diazomethan zugegeben bis eine leichte Gelbfärbung (Überschuss an Diazomethan) bestehen bleibt.

Die Proben werden mittels Stickstoff bei 40°C auf ca. 100 µl eingedampft und in ein Autosampler-Vial mit Insert überführt.

9) Messung am GC-MS:

Die Proben zuzüglich analog aufgearbeiteter Kalibrationsproben werden am GC-MS gemessen.

Einstellungen: Siehe Kapitel 2.4.3

Messprogramm: MassHunter Data Analysis Software

Auswertung: MassHunter Quantitation Software

2.4.4.2 GC-MS-Messung

2.4.4.2.1 Identifizierung der Substanzen mittels MS-Scan

Für die Identifizierung des Analyts und des internen Standards am GC-MS wurden zunächst beide Substanzen im Full-Scan-Modus über den Massenbereich von m/z

50 bis m/z 290 gemessen. Diese erhaltenen Massenspektren sind in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt.

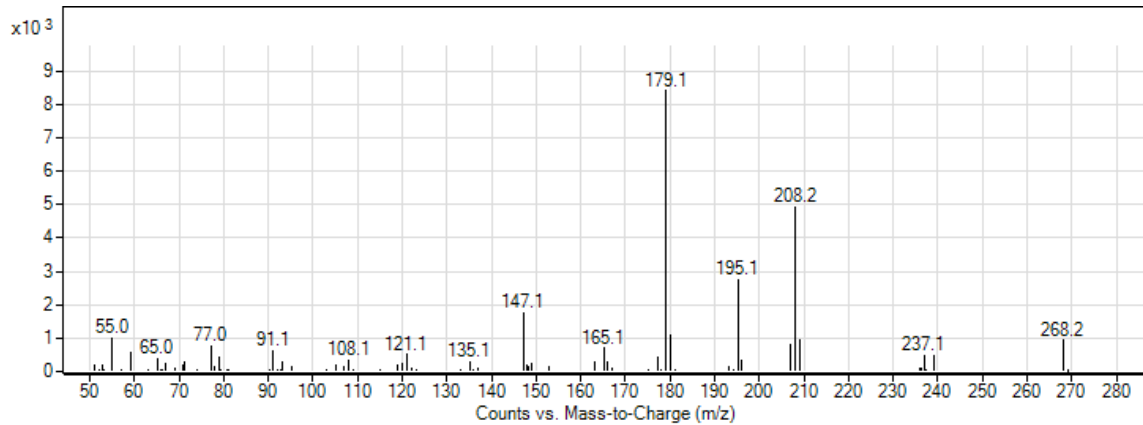


Abb.5a Massenspektrum von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure Methylester (Analyt)

Wie in dem Massenspektrum von CMPF zu sehen ist, zeigen sich neben dem Molekülion (m/z 268, 12%) folgende intensive Fragmentationen: m/z 179 (100%, Basepeak), 208 (59%), 195 (33%), und 147 (22%). Das Fragmentierungsmuster entspricht dem gegebenen Literaturspektren [110].

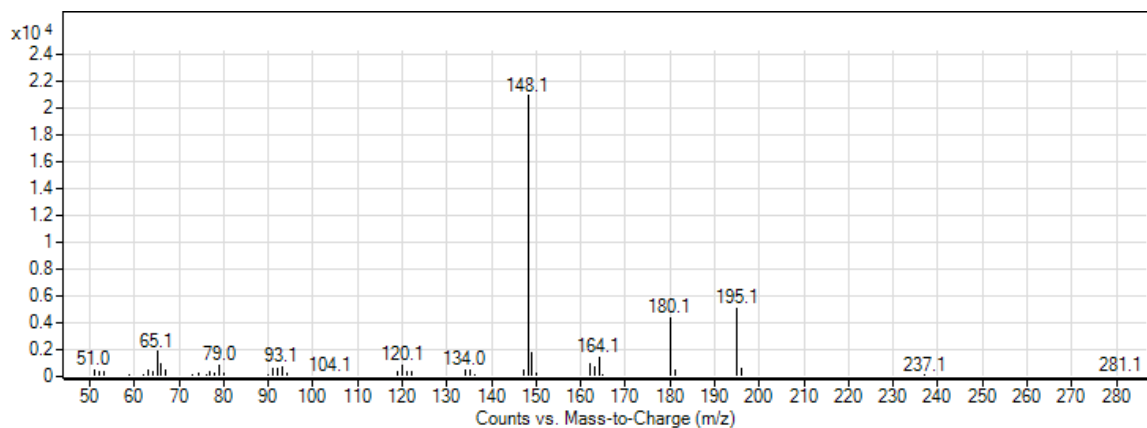


Abb.5b Massenspektrum von 4-Acetyl-3,5-dimethyl-2-pyrrolcarbonsäure Methylester (ISTD)

Das Massenspektrum des internen Standards (ISTD) zeigt neben dem Molekülion (m/z 195, 24%) die folgenden intensiven Fragmentationen: m/z 148 (100%, Basepeak), 195 (24%) und 180 (21%). Das Fragmentierungsmuster entspricht auch hier dem gegebenen Literaturspektren [109].

2.4.4.2.2 Quantifizierung von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure

Die GC-MS-Messung erfolgte im "Single-Ion-Monitoring" (SIM) Modus, welcher statt eines größeren Messbereichs (Scan-Modus) nur einzelne Ionen selektiv erfasst. Die Spezifität und Sensitivität ist bei diesem Modus erhöht, da durch eine längere Messzeit für jedes einzelne Ion die Nachweisempfindlichkeit signifikant steigt.

Die Ionenspur des Basepeaks (m/z 179) von CMPF zeigte bei Realproben keine störenden Interferenzen. Daher wurde dieses Fragmentation für die Quantifizierung (Quantifier) herangezogen. Die Fragmentionen m/z 208 und m/z 268 wurden als Qualifier für eine qualitative Peak-Kontrolle genutzt. Analog zum Analyten wurde für den internen Standard ISTD ebenfalls der Basepeak mit m/z 148 zur Quantifizierung (Quantifier) eingesetzt. Für die Identifizierung des ISTD wurde das Fragment m/z 195 verwendet.

Zur Quantifizierung von CMPF wurde dann das Peakflächenverhältnis aus den Ionen m/z 179 (CMPF) und m/z 148 (ISTD) gebildet.

Tabelle 11 zeigt die Zusammenfassung der von dem Analyten und ISTD eingesetzten Ionen m/z im SIM-Modus.

	Quantifier	Qualifier
CMPF	m/z 179	m/z 208
		m/z 268
ISTD	m/z 148	m/z 195

Tab.11 eingesetzte Ionen m/z von Analyt und ISTD im SIM-Modus

Nach der Strukturvalidierung wurden diese Ergebnisse für den Aufbau einer quantitativen analytischen GC-MS SIM-Methode (siehe Kap. 2.4.3) verwendet. Mit dieser neu etablierten Methode wurden in der Folge die CMPF-Studienproben gemessen. Abb.6 zeigt ein so erhaltenes Beispiel-Chromatogramm mit einem Totalionenchromatogramm der einzelnen ausgewählten Ionen für CMPF und ISTD.

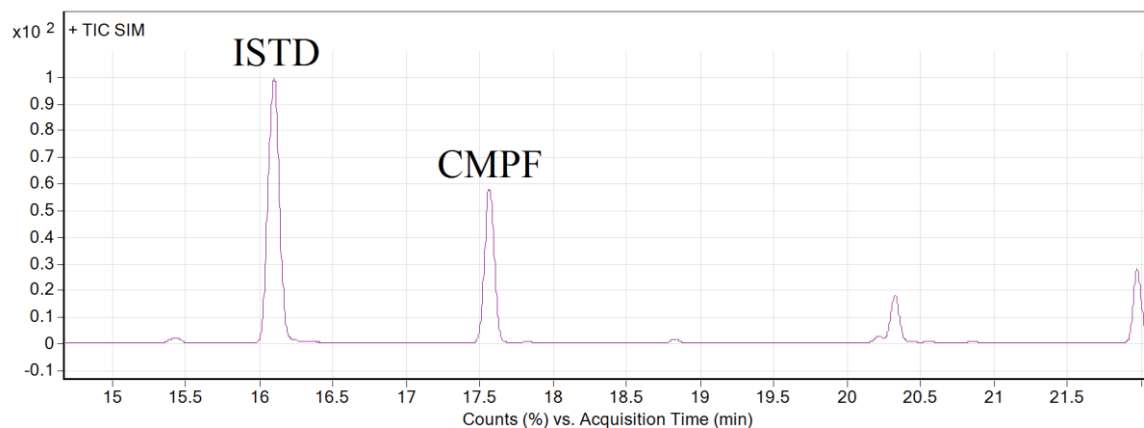


Abb.6 Chromatogramm einer Patientenprobe

Die Retentionszeiten für den Analyten (CMPF) und internen Standard (ISTD) betragen 17,6 und 16.2 Minuten.

2.4.4.3 Methodenetablierung mit Validierung

Mit dem für den Analyten ausgewählten Messbereich sollen sowohl erniedrigte als auch pathologische erhöhte Werte erfasst werden [125]. Es wurden daher sechs verschiedenen Konzentrationen für je eine Eichkurve und drei Kalibratoren (KAL) aus aufgestockten Poolplasmen mit CMPF wie folgt angesetzt:

Eichkurven Konzentrationen (CMPF-gespikte Plasmaproben)	
0	µg/ml
1,25	µg/ml
2,50	µg/ml
5,00	µg/ml
10,00	µg/ml
20,00	µg/ml

Tab.12 Eingesetzte Konzentrationen CMPF für die Eichkurven

Kalibrator	Konzentration
KAL 1	1,25 µg/ml
KAL 2	5,00 µg/ml
KAL 3	20,00 µg/ml

Tab.13 Konzentrationen der einzelnen Kalibratoren (KAL)

Im Anschluss wurden die Proben entsprechend der Labormethode zur Quantifizierung von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure im Plasma weiterverarbeitet. Die Messung der zur Ergebnisberechnung erforderlichen Kalibratoren erfolgte in Doppelbestimmung mit jeder aufgearbeiteten Probenserie. Aus den Analyt- und ISTD-Peakflächen der Studienproben wurden mittels Auswertesoftware und den Kalibrierdaten die Analyt-Konzentrationen automatisch berechnet.

Um die Qualität der neuen analytischen Methode zu überprüfen, wurden die Wiederfindung, die Linearität der Eichkurven, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Methodenrichtigkeit und -unpräzision bestimmt.

2.4.4.3.1 Wiederfindung

Unter der Wiederfindung versteht man das Verhältnis der Signalintensitäten die man erhält, wenn man die reinen Standardsubstanzen direkt misst, zu den Intensitäten nach einer vollständigen Probenaufarbeitung. Bei der Labormethode zur Quantifizierung von CMPF im Plasma bezieht sich die Wiederfindung in erster Linie auf den Extraktionsschritt mit der SPE-Kartusche, da die Arbeitsschritte der Derivatisierung und des Abdampfens sowie die Messung identisch sind.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden Dreifachbestimmungen mit und ohne Probenaufarbeitung von folgenden Konzentrationen an CMPF durchgeführt: 1,25 µg/ml, 5 µg/ml und 20 µg/ml.

2.4.4.3.2 Linearität

Als Maß für die Linearität der Methode über den gewählten Messbereich wurde für jeden Messtag der Korrelationskoeffizient R^2 der Eichkurven bestimmt.

2.4.4.3.3 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die mit der vorgegebenen Methode qualitativ noch erfasst werden kann und ist somit eine Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein des Analyten (limit of detection, LOD). Die Nachweisgrenze ist die niedrigste Konzentration eines Analyten, welche ein eindeutig vom Untergrund abgrenzbares Messsignal liefert.

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die quantitativ bestimmt werden kann und ist diejenige Konzentration, von der ab die Messung eine vorgegebene Anforderung an die Präzision erfüllt (limit of quantitation, LOQ). Unter der Bestimmungsgrenze versteht man die niedrigste Konzentration eines Analyten, deren Messsignal sich eindeutig vom Untergrund abhebt und gleichzeitig eine Aussage über die Menge des Analyten erlaubt. Somit liegt die Bestimmungsgrenze über der Nachweisgrenze.

Für die Nachweisgrenze nahmen wir eine Signal-Rausch-Verhältnis von 3 und für die Bestimmungsgrenze ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10 [135].

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze wurden die Signalthöhe und die Höhe des Rauschens bei drei Proben (Patientenprobe, kleinste Kalibrierprobe und niedrigste Eichprobe) am GC-MS gemessen.

2.4.4.3.4 Bestimmung der Unpräzision

Die Präzision drückt sich in der Streuung der einzelnen Messwerte durch grobe und zufällige Fehler aus und ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit einer Messung [54].

Für die Bestimmung der Präzision wurde ein Poolplasma aus ungefähr 200 Patientenproben erstellt. Danach wurden aus diesem Poolplasma acht verschiedene Eichkurven mit je sechs verschiedenen Konzentrationen an CMPF erstellt.

Jede Eichkurve wurde in Serie achtmal pro Tag in zwei Durchgängen aufgearbeitet und gemessen. Um die Präzision von Tag zu Tag zu bestimmen, wurden die Proben bei -20°C eingefroren und an fünf aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet und gemessen.

2.4.4.3.5 Bestimmung der Richtigkeit

Die Richtigkeit drückt sich in den Abweichungen der einzelnen Messwerte von einem definierten Zielwert durch systematische Fehler aus. Für die Bestimmung der Richtigkeit wurden ebenfalls die fünf CMPF-Konzentrationen der Eichkurve herangezogen [54].

2.4.5 Albuminbestimmung

Die Albuminbestimmungen erfolgten mittels photometrischer Bestimmungsmethoden mit Bromkresolgrün und Bromkresolpurpur sowie einer immunologischen Methode.

2.4.5.1 **Photometrische Bromkresolgrün (BCG) - Methode**

Die photometrische Albuminbestimmung mit der BCG-Methode erfolgte am Advia 1800 der Firma Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Deutschland. Diese Klinisch-Chemische Analysensysteme werden routinemäßig im Zentrallabor zur Bestimmung einer Vielzahl verschiedener Parameter wie Substrate, Enzyme und Proteine eingesetzt.

Das Messprinzip beruht hier auf einer quantitativen Bindung des BCG an das Plasma-Albumin mit Bildung eines Albumin-BCG-Komplexes. Die Konzentration wird anhand einer Endpunktreaktion photometrisch bei 596/694 nm ermittelt [104].

2.4.5.2 **Photometrische Bromkresolpurpur (BCP) - Methode**

Die photometrische Albuminbestimmung mit der BCP-Methode erfolgte ebenfalls an einem Advia 1800 der Firma Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Deutschland.

Wie bei der BCG-Methode beruht auch hier das Messprinzip auf einer quantitativen Bindung des BCP an das Plasma-Albumin mit Bildung eines Albumin-BCP-Komplexes. Die Konzentration wird wieder anhand einer Endpunktreaktion photometrisch bei 596/694 nm ermittelt [105].

2.4.5.3 Immunologische Methode

Die immunologische Albuminbestimmung erfolgte am BN ProSpec System der Firma Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Deutschland. Diese Systeme werden routinemäßig im Zentrallabor zur Bestimmung von verschiedenen Proteinen eingesetzt. Die nephelometrische Messung erfolgt hierbei mittels LED mit 840 +/- 25 nm im Winkel von 13-24° in Fixed-Time-Kinetik.

Die im Blut enthaltenen Proteine bilden mit spezifischen Antikörpern in einer immunchemischen Reaktion Immunkomplexe, an denen einstrahlendes Licht gestreut wird. Die Intensität des Streulichts in einem bestimmten Winkel ist dabei abhängig von der Konzentration des jeweiligen Proteins in der Probe. Durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration kann die Probe quantitativ ausgewertet werden [106].

2.4.6 Untersuchung des Einflusses von Medikamenten auf die Albuminbestimmung

Um einen möglichen Einfluss von CMPF und Medikamenten mit hoher Proteinbindung auf die Albuminbestimmung zu untersuchen, wurde das Plasma eines nüchternen Probanden, welcher zu dieser Zeit keine Medikamente einnahm, mit unterschiedlichen Medikamenten bzw. CMPF versetzt. Als Testsubstanzen wurden sechs Medikamente unterschiedlichen Einsatzgebiets, jedoch mit möglichst hoher Bindungskapazität für Albumin (Bindungsaffinitätskonstante k_A) ausgewählt (siehe Tab.14) [52]. Diese Substanzen wurden in aufsteigenden Konzentrationen dem Plasma zugesetzt. Anschließend wurde das Serumalbumin mit den unter 2.4.5 beschriebenen Bestimmungsmethoden vor und nach der Substanzzugabe bestimmt. Zum Schluss wurden die Ergebnisse miteinander verglichen.

Name	Typ	log K Wert
CMPF [52]		7,11
S-Naproxen [52]	NSAID	6,20
Lasix Injektionslösung, Furosemid [52]	Diuretikum	5,27
DL-Tryptophan [52]	Antidepressivum	4,59
Chloramphenicol [70]	Antibiotikum	6,22
L-Thyroxin [52]	Hormon	5,77
Phenprocoumon [124]	Antikoagulans	5,38

Tab.14 Bindungseigenschaften der eingesetzten Substanzen an Plasmaalbumin

Bei einem zum Abnahmezeitpunkt nüchternen Probanden, welcher mindestens 30 Tage vor Blutabnahme keine Medikamente eingenommen hatte, wurden 50 ml Vollblut in Heparin-Röhrchen abgenommen. Das Vollblut wurde zentrifugiert, das Plasma gewonnen und bis zur Versuchsdurchführung am gleichen Tag bei +8°C gekühlt gelagert. Zunächst wurde die Albuminkonzentration des Serums mittels der beiden photometrischen sowie der nephelometrischen Methode als Ausgangswert bestimmt. Die Herstellung der Lösungen erfolgte für alle Medikamente in Dimethylsulfoxid (DMSO) in jeweils fünf Endkonzentrationen C0 bis C4. Dabei wurde der Leerwert C0 mit reinem DMSO versetzt. Im Anschluss wurde das Albumin wiederum mittels der drei Methoden bestimmt.

	Endkonzentration
C0	0 µmol/l
C1	12,5 µmol/l
C2	50 µmol/l
C3	200 µmol/l
C4	2000 µmol/l

Tab.15 Medikamenten-Endkonzentrationen in DMSO

2.5 Patienten

Bei 124 Dialysepatienten und 101 Patienten ohne Dialyse wurde nach den routinemäßig angeforderten Bestimmungen von Albumin und weiterer Parameter CMPF aus Heparinplasma mittels GC-MS bestimmt. Die Probenentnahme fand bei den Dialysepatienten vor der Dialyse statt. Für die Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg vor (Az Studie 130/17).

3. Ergebnisse

3.1 Albuminbestimmung

Das Albumin wurde in der Gruppe der Dialysepatienten und der gesunden Kontrollgruppe mittels der beiden chromogenen Methoden BCG und BCP und der nephelometrischen Methode (BN ProSpec) bestimmt. Im Anschluss erfolgte der Vergleich zwischen den einzelnen Methoden und den beiden Gruppen.

Dialysepatienten

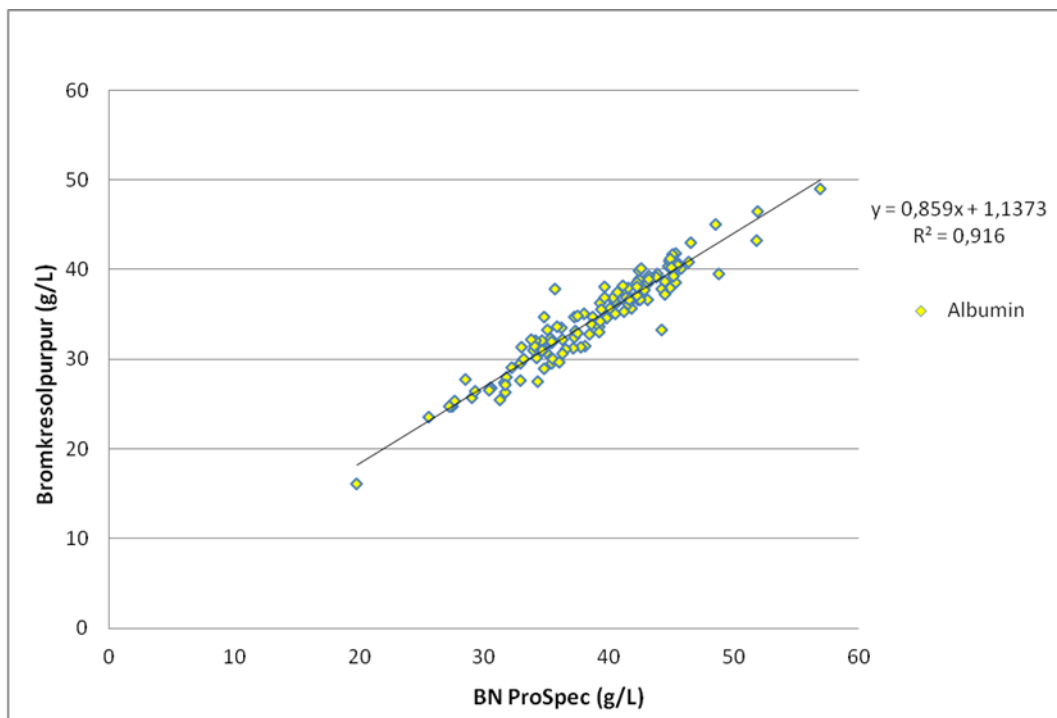


Abb.7 Methodenvergleich BCP und BN Pro Spec bei Dialysepatienten

Es zeigt sich, dass mit der BCP Methode das Albumin immer niedriger im Vergleich zur immunologischen Methode gemessen wird. Im Bereich normalwertiger (50 g/L), niedriger (35 g/L) und deutlich erniedrigter Werte (20 g/L) ergeben sich folgende Werte:

Albumin [g/L]		
BCP	BNProspec	Delta
44,1	50,0	-13,4%
31,2	35,0	-12,2%
18,3	20,0	-9,2%

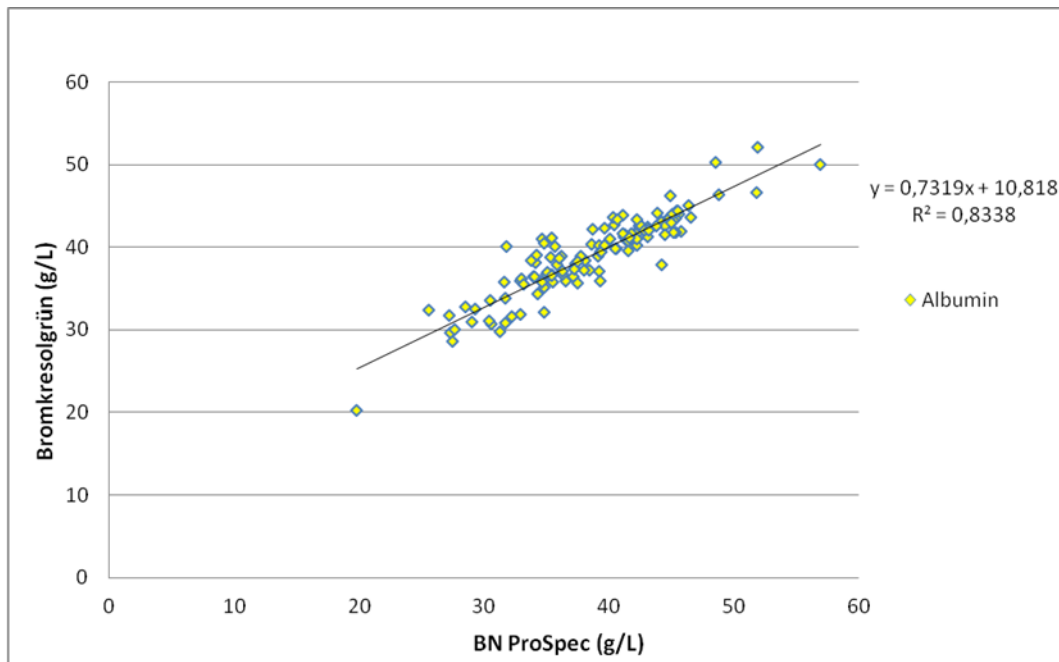


Abb.8 Methodenvergleich BCG und BN Pro Spec bei Dialysepatienten

Es zeigt sich, dass mit der BCG Methode das Albumin im Vergleich zur immunologischen Methode im Bereich normalwertiger Albuminkonzentrationen (50 g/L) leicht niedrigere, bei niedrigen (35 g/L) und deutlich erniedrigten Werten (20 g/L) aber höhere Werte liefert:

BCG	BNProspec	Delta
47,4	50,0	-5,5%
36,4	35,0	3,9%
25,5	20,0	21,4%

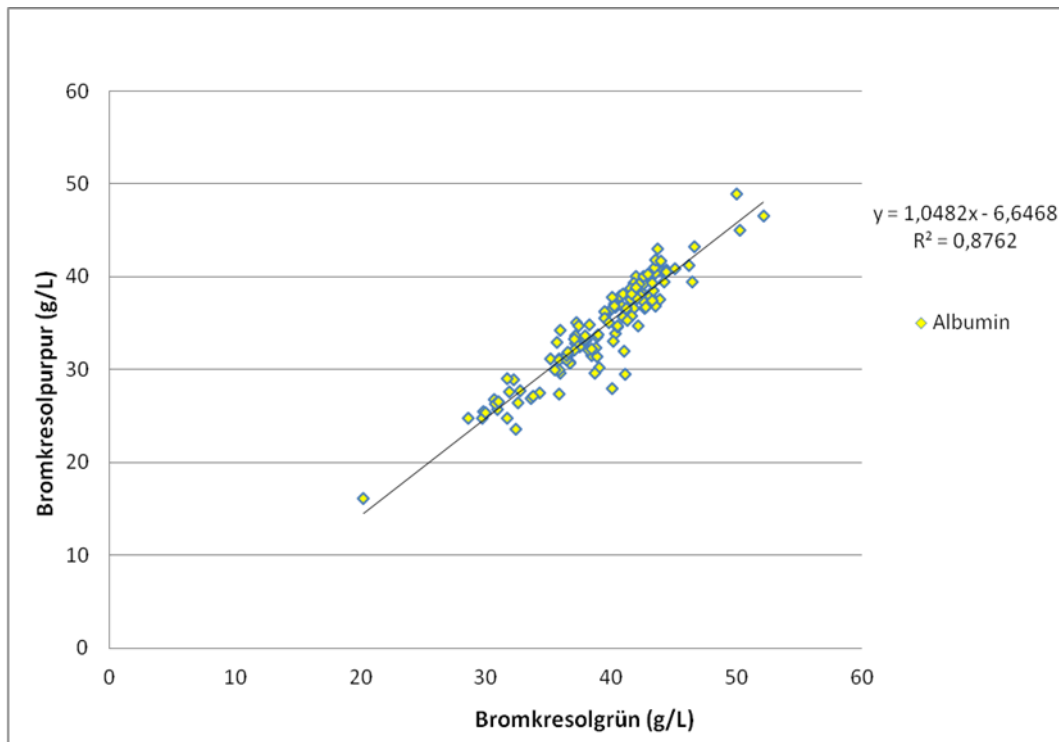


Abb.9 Methodenvergleich BCP und BCG bei Dialysepatienten

Mit der BCP Methode wird das Albumin bei Dialysepatienten im Vergleich zur BCG Methode immer niedriger gemessen: Im Bereich normalwertiger (50 g/L), niedriger (35 g/L) und deutlich erniedrigter Werte (20 g/L) ergeben sich folgende Werte:

Albumin [g/L]		
BCP	BCG	Delta
45,8	50,0	-9,3%
30,0	35,0	-16,5%
14,3	20,0	-39,7%

Dabei ist die Abweichung im unteren und deutlich erniedrigten Albuminbereich (20 g/L) mit 39,7 % besonders gravierend.

Nachstehende Abbildung zeigt die mit abnehmender Albuminkonzentration zunehmende prozentuale Abweichung der mittels BCP bestimmten Albuminwerte:

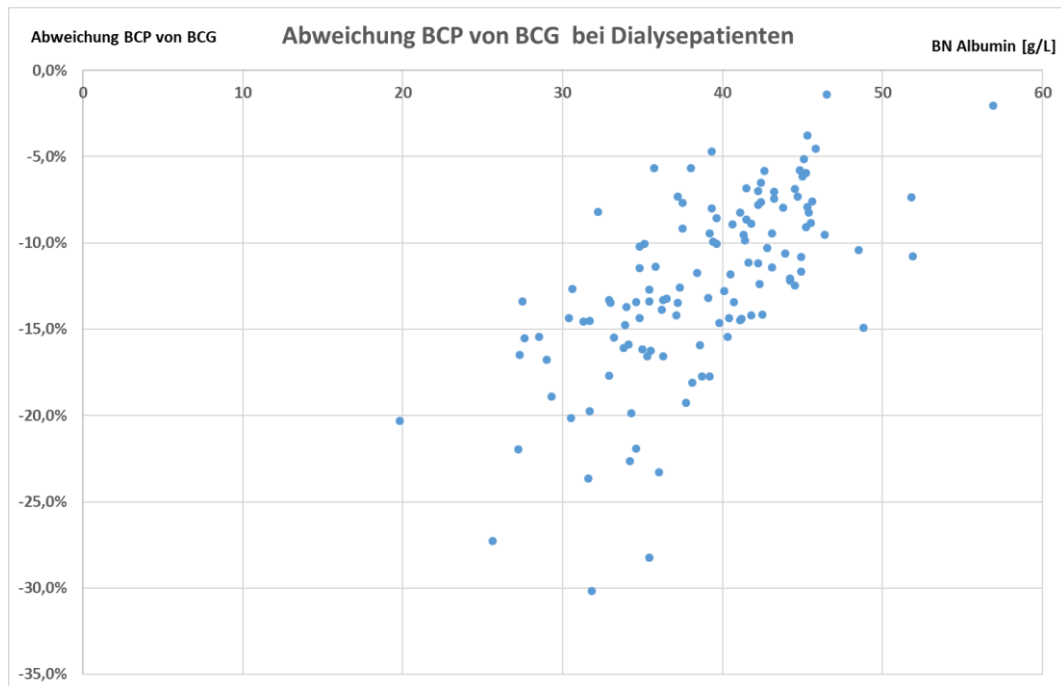


Abb.10 Abweichung der BCP bestimmten Albuminwerte in Abhängigkeit der Albuminkonzentration bei Dialysepatienten

Nicht-Dialysepatienten

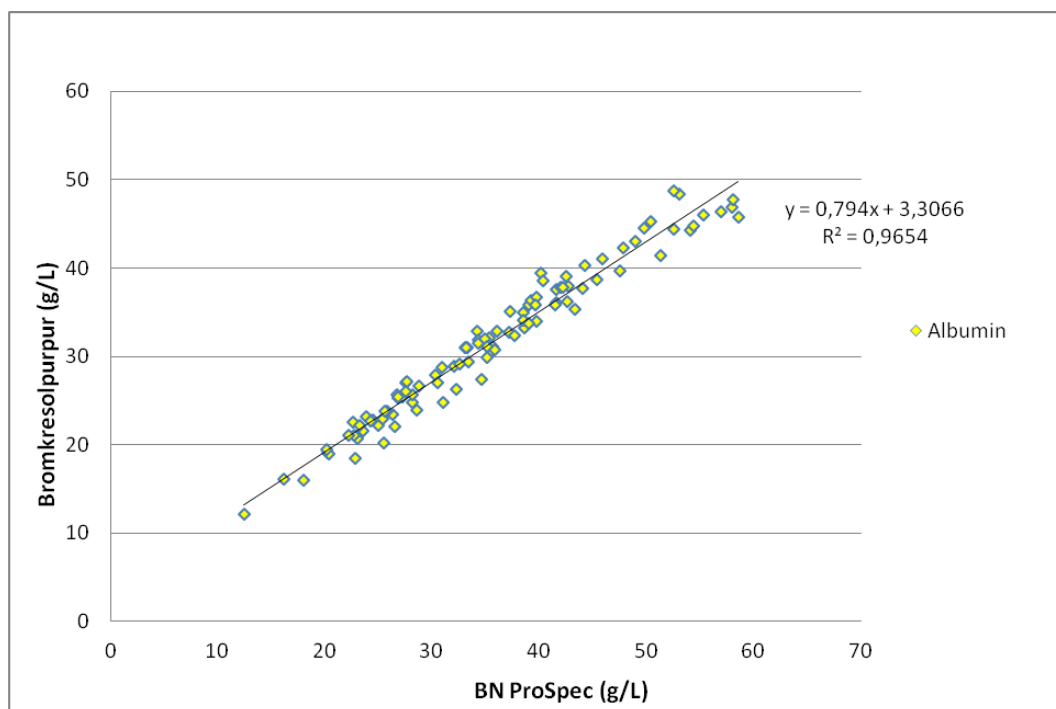


Abb.11 Methodenvergleich BCP und BN Pro Spec bei Nicht-Dialysepatienten

Es zeigt sich, dass mit der BCP Methode das Albumin wie bei den Dialysepatienten immer niedriger im Vergleich zur immunologischen Methode gemessen wird. Im Bereich normalwertiger (50 g/L), niedriger (35 g/L) und deutlich erniedrigter Werte (20 g/L) ergeben sich folgende Werte:

Albumin [g/L]		
BCP	BNProspec	Delta
43,0	50,0	-16,3%
31,1	35,0	-12,6%
19,2	20,0	-4,2%

Im Vergleich zu einer Korrelation von $r=0,916$ bei den Dialysepatienten ist hier allerdings eine etwas bessere Korrelation mit $r=0,9654$ der beiden Methoden zu sehen.

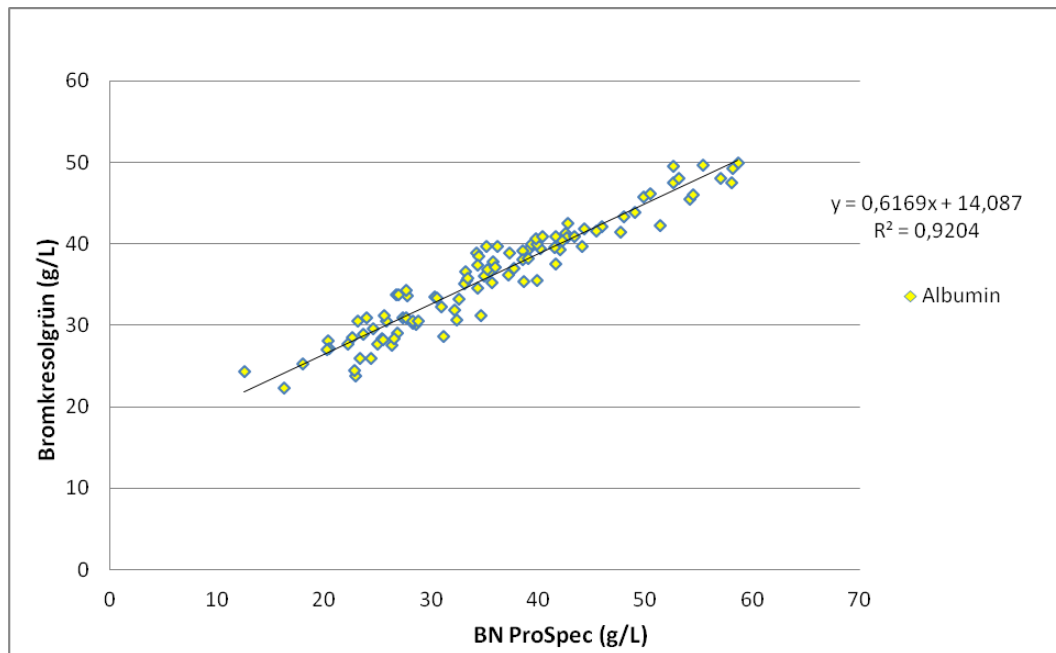


Abb.12 Methodenvergleich BCG und BN Pro Spec bei Nicht-Dialysepatienten

Es zeigt sich, dass mit der BCG Methode das Albumin ähnlich wie bei den Dialysepatienten im Vergleich zur immunologischen Methode im Bereich normalwertiger Albuminkonzentrationen (50 g/L) leicht niedrigere, bei niedrigen (35 g/L) und deutlich erniedrigten Werten (20 g/L) aber höhere Werte liefert:

Albumin [g/L]		
BCG	BNProspec	Delta
44,9	50,0	-11,3%
35,7	35,0	1,9%
26,4	20,0	24,3%

Im Vergleich zu einer Korrelation von $r=0,8338$ bei den Dialysepatienten ist hier allerdings eine bessere Korrelation mit $r=0,9204$ der beiden Methoden zu sehen.

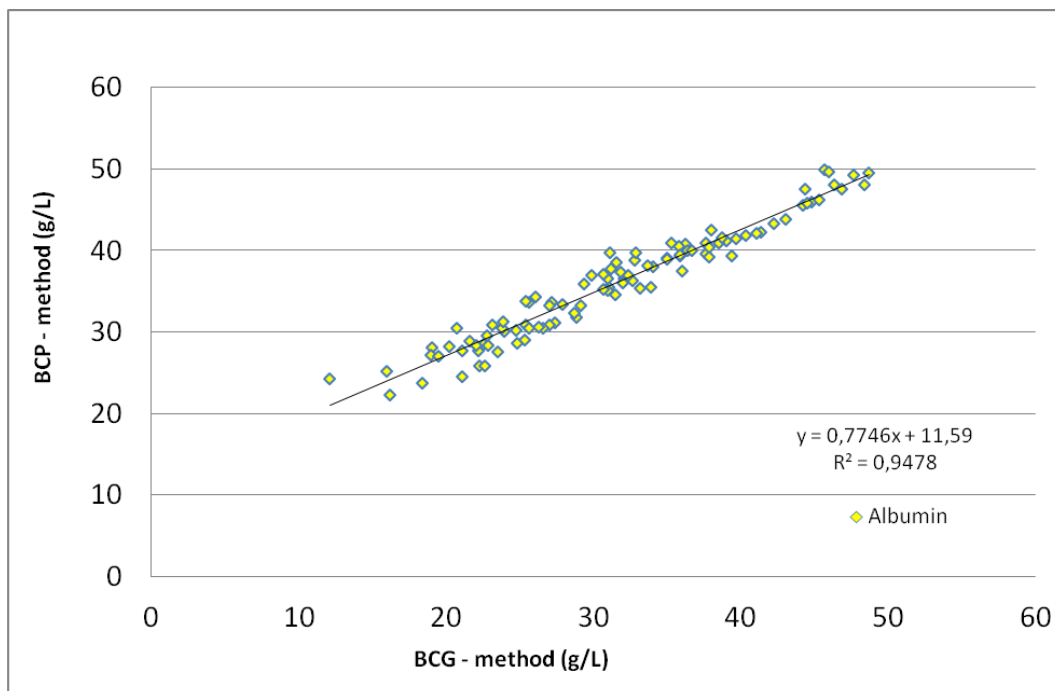


Abb.13 Methodenvergleich BCP und BCG bei Nicht-Dialysepatienten

Mit der BCP Methode wird das Albumin im Vergleich zur BCG Methode bei den Nicht-Dialysepatienten anders als bei den Dialysepatienten immer höher gemessen: Im Bereich normalwertiger (50 g/L), niedriger (35 g/L) und deutlich erniedrigter Werte (20 g/L) ergeben sich folgende Werte:

Albumin [g/L]		
BCP	BCG	Delta
50,3	50,0	0,6%
38,7	35,0	9,6%
27,1	20,0	26,2%

3.2 Quantifizierung von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure im Plasma

3.2.1 Eichkurven

Entsprechend der Labormethode unter 2.4.4 wurden die Eichkurven achtmal pro Tag in zwei Durchgängen an fünf Tagen aufgearbeitet und gemessen. Abb.14 zeigt eine typische Eichkurve. Hierbei wird das Peak-Flächenverhältnis von CMPF (Quantifier ion m/z 179) zu internem Standard (Quantifier ion m/z 148) gegen die bekannte CMPF-Konzentration aufgetragen. Der Korrelationsfaktor R^2 als Maß für die Qualität der Eichkurven lag für alle Eichkurven zwischen 0,9717 und 0,9990.

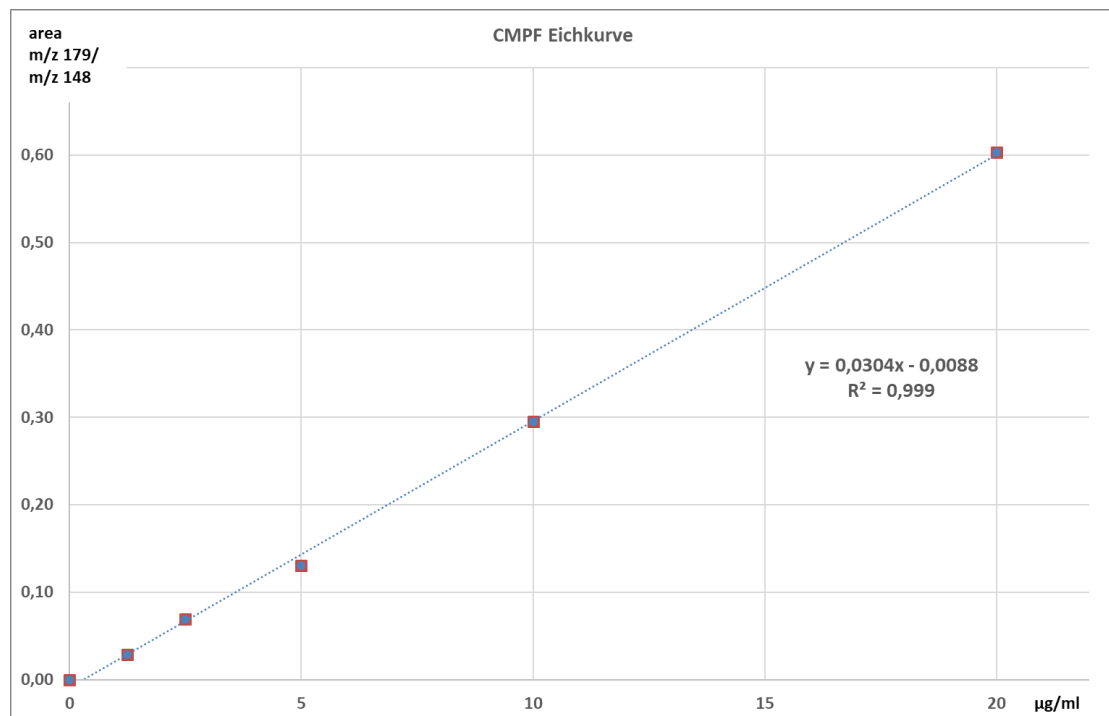


Abb.14 Typische Eichkurve CMPF

3.2.2 Wiederfindung

Bei der Labormethode zur Quantifizierung von CMPF im Plasma bezieht sich die Wiederfindung in erster Linie auf den Extraktionsschritt mit der SPE-Kartusche, da die Arbeitsschritte der Derivatisierung und des Abdampfens sowie die Messung identisch sind.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden Dreifachbestimmungen von folgenden Konzentrationen an CMPF vorgenommen: 1,25 µg/ml 5 µg/ml und 20 µg/ml. Die Ergebnisse der Mittelwerte der Wiederfindung und der relativen Standardabweichungen (SD) sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Konzentrationen in µg/ml	Wiederfindung in %	relative SD in %
1,25	118,3	8,2
5,00	80,9	3,8
20,00	66,3	14,2

Tab.16 Ergebnisse der Mittelwerte Wiederfindung und relativen Standardabweichungen

3.2.3 Statistische Qualitätskontrolle

3.2.3.1 **Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze**

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze wurde die Signalthöhe der CMPF und die Höhe des Rauschens bei drei zufällig ausgewählten Proben (einer Patientenprobe, einer kleinsten Kalibrierprobe und einer niedrigsten Eichprobe) am GCMS gemessen.

Für die Nachweisgrenze von CMPF im Plasma ergab sich ein Mittelwert von 0,01 µg/ml mit einem Signal-Rauschverhältnis von S/N=3. Die Bestimmungsgrenze lag bei einem Mittelwert von 0,04 µg/ml mit einem Signal-Rauschverhältnis von S/N=10.

3.2.3.2 Unpräzision

Für die Bestimmung der Unpräzision wurde ein Poolplasma aus ungefähr 200 Patientenproben erstellt. Danach wurden aus diesem Poolplasma sechs verschiedene Eichkurven in unterschiedlicher Konzentration an CMPF erstellt (siehe Tab.12 unter 2.4.4.3). Jede Eichkurve wurde in Serie achtmal pro Tag in zwei Durchgängen aufgearbeitet und gemessen und für die Bestimmung der Unpräzision in Serie (n=8) und die Unpräzision von Tag zu Tag (n=5) eingesetzt. Für die Bestimmung der Unpräzision von Tag zu Tag wurden die Proben bei -20°C eingefroren und an fünf aufeinander folgenden Tagen aufgearbeitet und gemessen. In der nachfolgenden Tab.17 sind die Werte der Variationskoeffizienten (VK) dargestellt:

Konzentration (µg/ml)	VK (%) in Serie	VK (%) von Tag zu Tag
1,86	12,8	29,7
2,91	6,7	20,9
5,12	6,5	15,2
9,92	4,3	11,6
18,41	5,3	15,2

Tab.17 Unpräzision der CMPF-Bestimmung im Plasma

3.2.3.3 Richtigkeit

Für die Bestimmung der Richtigkeit wurden die fünf folgenden Konzentrationen an CMPF für jeweils eine Eichkurve achtmal: 1,25µg/ml, 2,50µg/ml, 5,00µg/ml, 10µg/ml und 20,00µ/ml. Die Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung SD) für die Richtigkeit sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

CMPF in µg/ml	1,25	2,50	5,00	10,00	20,00
Gemessen	1,28	2,48	5,34	10,71	20,36
SD	0,40	0,44	0,76	1,22	2,36

Tab.18 Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit

3.2.4 Ergebnisse der Patientenproben

Die Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), Minimum (Min) und Maximum (Max) der Messwerte (n) der Quantifizierung von CMPF zusammen mit Kreatinin und Harnstoff in den Patientenproben sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

	Non-Dialyse	Dialyse	Non-Dialyse	Dialyse	Non-Dialyse	Dialyse
	Kreatinin [mg/dl]		Harnstoff [mg/dl]		CMPF [µg/ml]	
Min	0,27	2,07	11,00	43,00	0,02	0,17
Max	7,03	15,08	200,00	233,00	6,45	13,06
SEM	0,12	0,74	6,01	12,96	0,12	0,31
MW	1,25	7,62	60,70	133,39	1,22	3,24
SD	1,07	3,31	41,13	35,50	1,18	2,96
n	102	106	102	106	102	106

Tab.19 Mittelwerte der Messwerte der Patientenproben

In den Proben der Dialysepatienten wurde deutlich mehr CMPF als in den Proben der Nicht-Dialysepatienten nachgewiesen. Entsprechendes gilt für Kreatinin und Harnstoff.

3.3 Untersuchung des Einflusses von Medikamenten auf die Albuminbestimmung

Bei dieser Versuchsreihe wurde der mögliche Einfluss von CMPF und Medikamenten mit hohen Albumin-Bindungsaffinitäten auf die verschiedenen Albuminbestimmungsmethoden untersucht. Hierfür wurde das Plasma eines nüchternen Probanden mit den Medikamenten oder CMPF in aufsteigenden Konzentrationen versetzt und anschließend das Albumin mittels der beiden chromogenen Methoden BCP und BCG und der nephelometrischen Methode als Referenzmethode bestimmt.

Die Versuchsreihe mit CMPF-gespickten Plasmaproben zeigte eine falsch-negative Abweichung der Albuminbestimmung für die BCP-Methode ab 25 µmol/L, die mit zunehmender CMPF-Konzentration weiter zunimmt. Im Vergleich dazu konnte man bei der BCG-Methode keine signifikanten negativen Abweichungen der

gemessenen Werte bei höherer CMPF-Konzentration erkennen. Die Abweichungen sind bezogen auf den immunologisch bestimmten Albuminwert von 45,6 g/l, der sich durch Zugabe von CMPF nicht ändert.

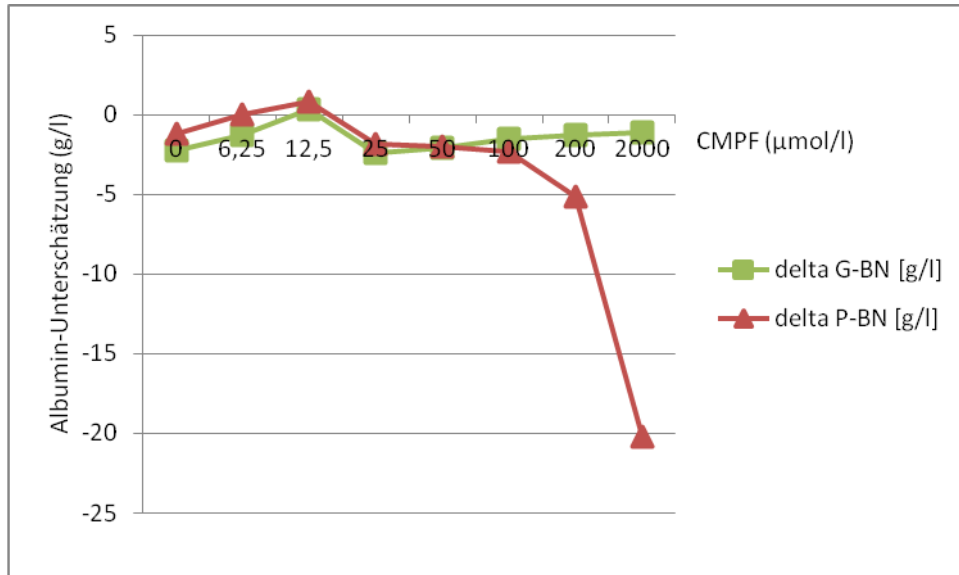


Abb.15 Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von CMPF auf die Albuminbestimmung

Delta G-BN: Albuminwert G (BCG-Methode) minus Albuminwert BN (immunologisch)

Delta P-BN: Albuminwert P (BCP-Methode) minus Albuminwert BN (immunologisch)

Dieser Effekt ist für mittlere CMPF-Konzentration und niedrige Albuminkonzentrationen besonders ausgeprägt: Tab.20 zeigt die Differenz der mit den BCG und BCP Methoden bestimmten Albuminwerte in Abhängigkeit der CMPF- und Albuminkonzentration der Probe. Allerdings spielt bei sehr hohen CMPF-Konzentration die unterschiedliche Albuminkonzentration eine geringere Rolle bei den methodenbedingten Differenzen.

BN - Albumin [g/L]		40,4	29,4	19,1	40,4	29,4	19,1
		BCG -BCP [g/L]	BCG -BCP [g/L]	BCG -BCP [g/L]	(BCG -BCP) /BCG	(BCG -BCP) /BCG	(BCG -BCP) /BCG
0	CMPF [μmol/L]	-0,89	-0,17	0,55	-2,3%	-0,6%	2,7%
12,5	CMPF [μmol/L]	-0,43	0,19	1,17	-1,1%	0,6%	5,9%
50	CMPF [μmol/L]	0,41	1,42	1,92	1,1%	4,8%	9,6%
200	CMPF [μmol/L]	3,18	4,52	4,47	8,2%	15,3%	22,3%
2000	CMPF [μmol/L]	16,84	13,6	9,85	43,3%	45,8%	49,0%

Tab.20 Einfluss der Albuminkonzentration auf die CMPF bedingten Unterschiede der Albuminbestimmung mittels BCG- und BCP-Methode

BCG-BCP: Albuminwert (BCG-Methode) minus Albuminwert (BCP-Methode)

(BCG-BCP)/BCG: relative Abweichung bezogen auf den mittels BCG-Methode bestimmten Albuminwert

BN-Albumin: immunologisch bestimmtes Albumin

In den Versuchsreihen der Medikamente mit hoher Albuminbindung verhalten sich die Abweichung der Albuminwerte mit den verschiedenen Messmethoden sehr unterschiedlich. Bei Tryptophan, Chloramphenicol, Phenprocoumon und Thyroxin zeigte sich, dass die Abweichungen der Albuminwerte mit der BCP-Methode zum Teil deutlich geringer waren als mit der BCG-Methode. Bei Naproxen kommt es sogar zu einer deutlichen Überschätzung der Albuminwerte mit der BCP-Methode.

Auch hier zeigt sich eine, wenn auch deutlich geringere Abhängigkeit der Differenzen der mit den BCG und BCP Methoden bestimmten Albuminwerte von der Albuminkonzentration der Probe.

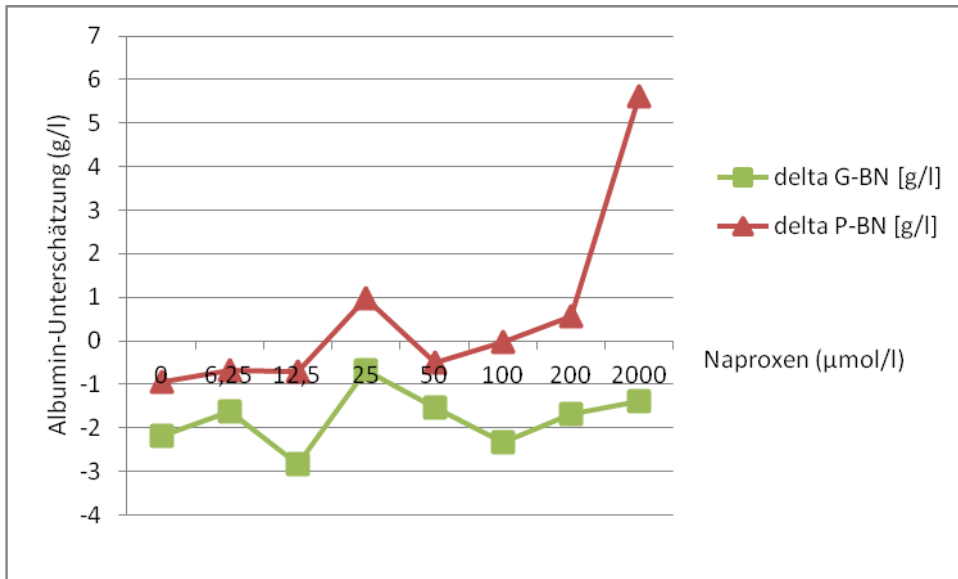


Abb.16 Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Naproxen auf die Albuminbestimmung

Delta G-BN: Albuminwert G (BCG-Methode) minus Albuminwert BN (immunologisch)

Delta P-BN: Albuminwert P (BCP-Methode) minus Albuminwert BN (immunologisch)

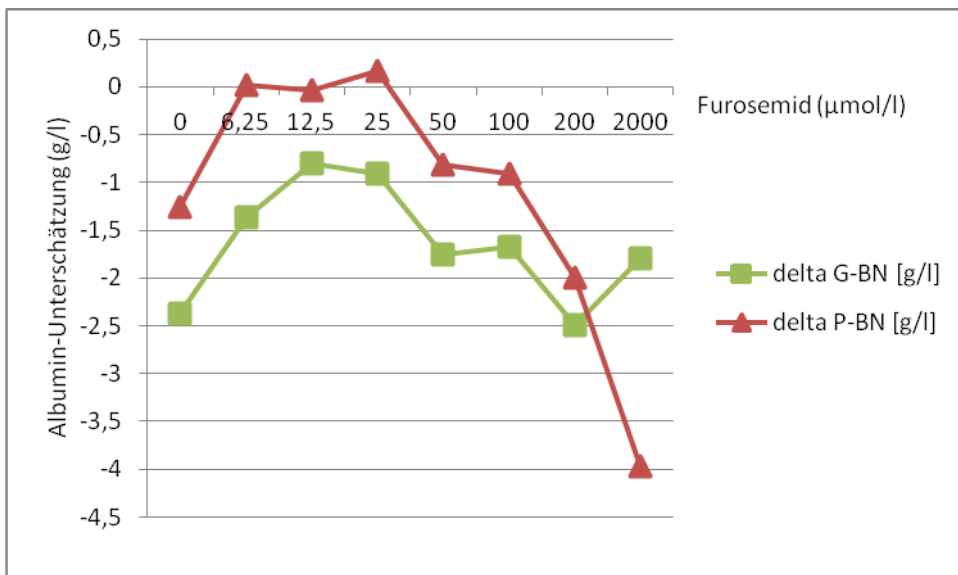


Abb.17 Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Furosemid auf die Albuminbestimmung

Delta G-BN: Albuminwert G (BCG-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

Delta P-BN: Albuminwert P (BCP-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

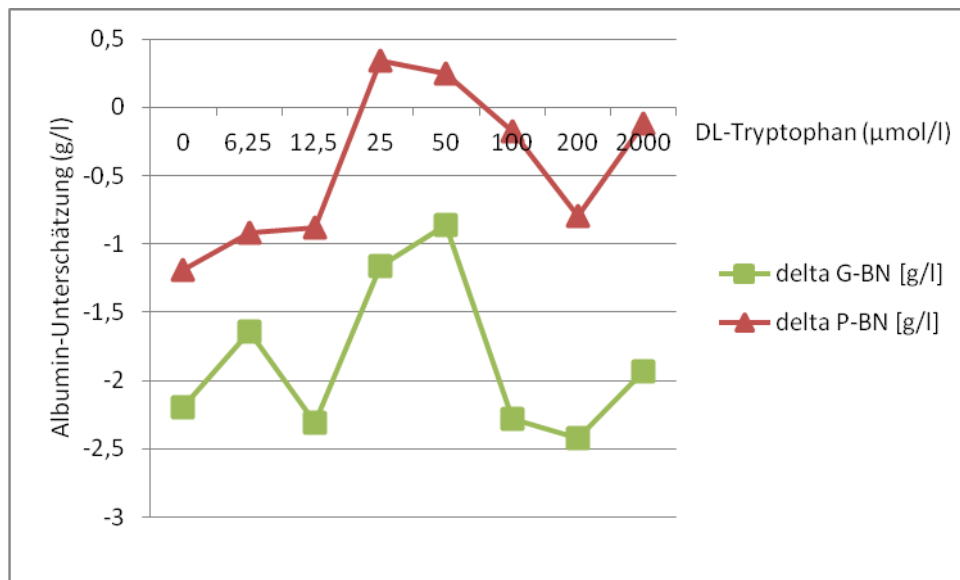


Abb.18 Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von DL-Tryptophan auf die Albuminbestimmung

Delta G-BN: Albuminwert G (BCG-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

Delta P-BN: Albuminwert P (BCP-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

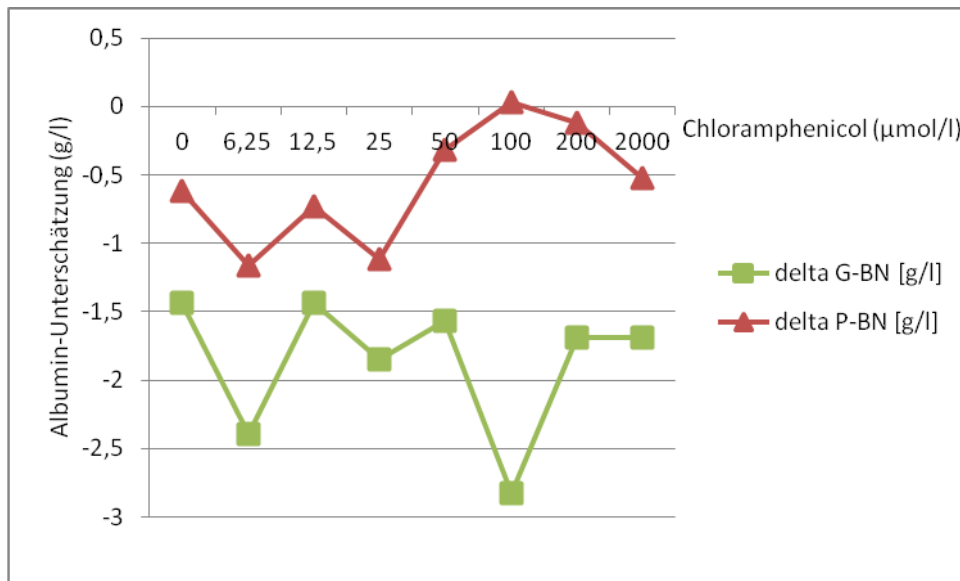


Abb.19 Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Chloramphenicol auf die Albuminbestimmung

Delta G-BN: Albuminwert G (BCG-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

Delta P-BN: Albuminwert P (BCP-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

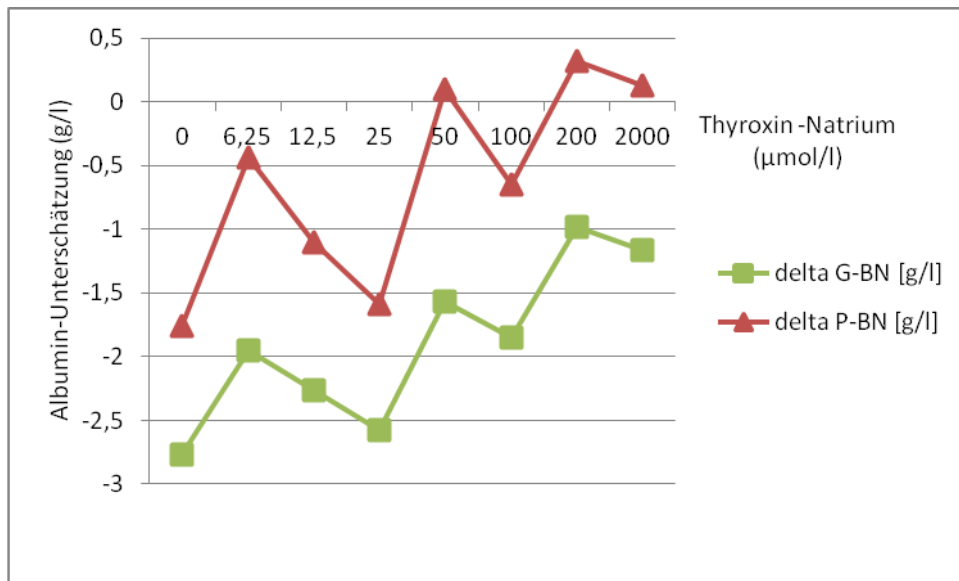


Abb.20 Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Thyroxin-Natrium auf die Albuminbestimmung

Delta G-BN: Albuminwert G (BCG-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

Delta P-BN: Albuminwert P (BCP-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

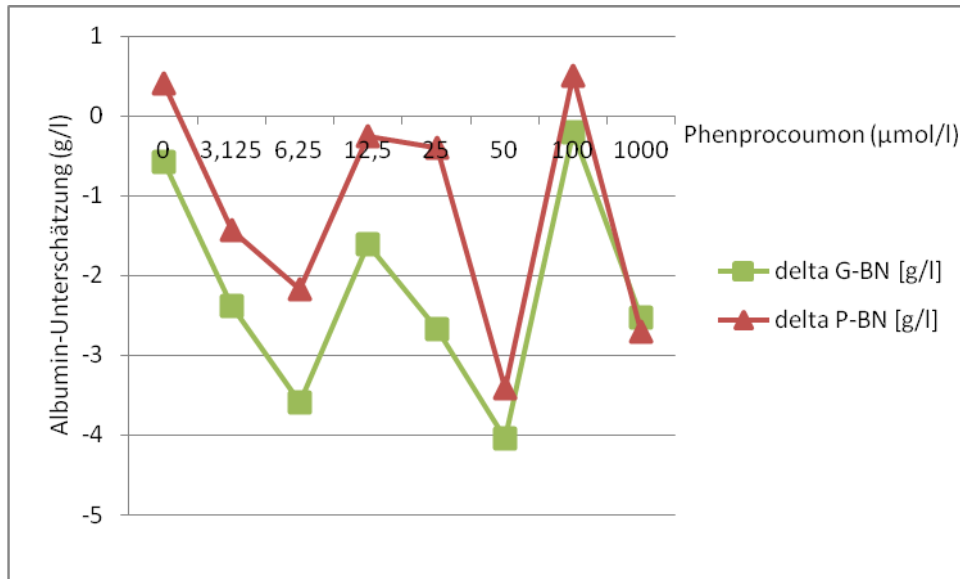


Abb.21 Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Phenprocoumon auf die Albuminbestimmung

Delta G-BN: Albuminwert G (BCG-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

Delta P-BN: Albuminwert P (BCP-Methode) minus Albuminwert BN
(immunologisch)

4. Diskussion

Heutzutage stehen der klinischen Routinediagnostik zwei unterschiedliche chromogene und verschiedene immunologische Methoden für die Albuminbestimmung zur Verfügung [39]. Dabei gelten die immunologischen Methoden als Goldstandard, da sie eine hohe Präzision mit geringer Störanfälligkeit besitzen [29, 39, 107].

Aus diesen Gründen entschied man sich in dieser Studie, eine immunologische (hier Immunnephelometrie) als Referenzmethode zu verwenden, um die BCP- und BCG-Methoden zur Albuminbestimmung bei Hämodialysepatienten und Nicht-Hämodialysepatienten zu beurteilen. Um eine Aussage über die Anwendbarkeit der neuen BCP-Methode bei Hämodialysepatienten treffen zu können, wurden die Albuminbestimmungsmethoden untereinander und beide Gruppen miteinander verglichen.

Dabei zeigte sich bei der neuen Advia Bromkresolpurpur-Methode (BCP) im Vergleich zur vorherigen Bromkresolgrün-Methode (BCG) in der Gruppe der Dialysepatienten ein negativer Bias für die Albuminwerte. Dieser war besonders in hypoalbuminämischen Proben ausgeprägt und verringerte sich proportional mit steigenden Albuminkonzentrationen. So entsprach ein Albuminwert von 20,0 g/l für die BCG-Methode nur einem Albuminwert von 14,3 g/l für die BCP-Methode. Dies macht somit eine negative Abweichung von 39,7% aus. In der Gruppe der Nicht-Dialysepatienten konnte kein negativer Bias der BCP-Methode gegenüber der BCG-Methode nachgewiesen werden. Hier zeigte sich sogar insbesondere bei hypoalbuminämischen Proben eine Überschätzung der Albuminwerte durch die BCP-Methode.

Im Vergleich zwischen der BCP-Methode und der nephelometrischen Referenz-Methode konnte ein negativer Bias für die BCP-Methode sowohl in der Gruppe der Dialysepatienten, als auch in der Gruppe der Nicht-Dialysepatienten nachgewiesen werden. Für die BCG-Methode zeigte sich im Vergleich zur immunologischen Referenzmethode bei hypoalbuminämischen Proben in beiden Patientengruppen eine Überschätzung der Albuminwerte.

In der Versuchsreihe mit CMPF-gespickten Plasmaproben zeigte sich eine falsch negative Abweichung der Albuminwerte durch die BCP-Methode ab 25 $\mu\text{mol/L}$ CMPF, die mit zunehmenden CMPF-Konzentrationen weiter zunahm und insbesondere bei niedrigen Albuminkonzentrationen ausgeprägt war. Im Gegensatz hierzu konnte man bei der BCG-Methode keine signifikanten negativen Abweichungen der gemessenen Albuminwerte bei höheren CMPF-Konzentrationen erkennen.

Als mögliche Ursache für die Unterschätzung der Albuminwerte bei Hämodialysepatienten durch die BCP-Methode vermuteten wir, wie bereits Mabuchi et al. [67], die Furansäure CMPF. Diese [67] erkannten bereits 1987, dass es sich bei CMPF um einen bedeutenden Einflussfaktor der Albuminbestimmung mittels BCP handelt. Bei Hämodialysepatienten kommt es im Laufe der Zeit zu einer Akkumulation von CMPF im Blut [37, 57, 75], da es aufgrund seiner hohen Albuminbindungswerte [43, 56, 75, 78] durch gängige Dialysverfahren nur schwer bzw. teilweise gar nicht aus dem Blut zu entfernen ist [7, 43, 44, 57, 58, 81, 108]. Auch in unserer Studie wurden in den Proben der Dialysepatienten durchschnittlich deutlich höhere CMPF-Konzentrationen als in den Proben der Nicht-Dialysepatienten nachgewiesen. Da CMPF die Eigenschaft besitzt, unterschiedliche Substanzen aus der Albuminbindung zu verdrängen [37, 75], könnte es auch den Farbstoff BCP verdrängen und so zu falsch niedrig gemessenen Albuminwerten führen [67].

Neben unserer Studie konnten auch einige andere Studien eine Unterschätzung der Albuminwerte durch die BCP-Methode insbesondere bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Hämodialyse feststellen [3, 50, 67, 69, 136].

Mabuchi et al. [67] stellten im Vergleich zu einer immunologischen Methode eine statistisch signifikante Unterschätzung der Albuminwerte durch die BCP-Methode bei Hämodialysepatienten fest. Das Ausmaß der Unterschätzung korrelierte hierbei gut mit den Serumkonzentrationen von CMPF in urämischem Blut. In den Proben von gesunden Personen wurden geringe negative Abweichungen der Albuminwerte festgestellt, welche jedoch statistisch nicht relevant waren ($p > 0,005$). Dahingegen schien CMPF die BCG-Messungen nicht zu beeinflussen. Daraus zogen die

Autoren [67] den Schluss, dass es sich bei CMPF um einen großen Einflussfaktor bei der Unterschätzung der Albuminwerte bei Hämodialysepatienten durch die BCP-Methode handelt.

Verglichen mit unserer Studie wurden zwar im Blut der Hämodialysepatienten höhere CMPF-Konzentrationen im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe festgestellt, es konnte jedoch keine Korrelation zwischen den CMPF-Serumwerten und dem negativen Bias der BCP-Methode beobachtet werden.

Ein paar Jahre zuvor konnten Wells et al. [136] und Maguire et al. [69] ebenfalls eine Unterschätzung der Albuminwerte bei Hämodialysepatienten durch die BCP-Methode nachweisen. So wurden in der Studie von Maguire et al. [69] die Albuminwerte von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz teilweise um mehr als 9 g/l unterschätzt. Hierbei war es unerheblich, ob die Patienten eine Hämodialyse erhielten oder eine Nierentransplantation erhalten hatten. Das Ausmaß der Abweichung, welches durch den Serumkreatininwert beurteilt wurde, konnte jedoch nicht mit der Schwere der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden. In den Proben von gesunden Personen konnten Maguire et al. [69] keine fehlerhafte Abweichung der Albuminwerte durch die BCP-Methode im Vergleich zu einer immunologischen Methode feststellen. Eine mögliche Ursache für die fehlerhaften Ergebnisse durch die BCP-Methode könnten laut der Autoren [69] Störsubstanzen aus der Gruppe der Retentionssubstanzen in urämischem Blut sein, welche die Albuminbindung des BCP-Farbstoffes an das Albumin verhindern bzw. stören. Folgt man dieser These, dass kompetitive Inhibitoren die Ursache für die Fehleinschätzung der Albuminwerte sind, würde man erwarten, dass hohe Konzentrationen von BCP diese Interferenz aufheben. Diese Vermutung konnte jedoch in den anschließenden Experimenten nicht bestätigt werden [69]. Daraus zogen die Autoren [69] den Schluss, dass BCP eine niedrige Bindungsaffinität zu Albumin besitzt. Dies ist möglicherweise eine Erklärung dafür, dass die BCP-Methode eine hohe Störanfälligkeit besitzt, wenn, wie in urämischem Blut, eine hohe Anzahl an Substanzen mit hoher Albuminbindung wie zum Beispiel CMPF vorhanden ist, welche gleichzeitig um die Albuminbindung konkurrieren. Auch in unserer Studie wäre dies eine mögliche Erklärung für den negativen Bias der BCP-Albuminbestimmung bei Hämodialysepatienten.

Eine weitere Erklärung für die fehlerhaften BCP-Messungen könnte laut Maguire et al. [69] eine strukturelle Änderung der Albuminbindungsstelle im Blut von Hämodialysepatienten sein, welche eine Bindung von BCP an das Albumin unmöglich mache. Da jedoch die Bindung des BCG-Farbstoffes selbst in urämischem Blut unbeeinträchtigt zu sein scheint, ist die Erklärung laut der Autoren [69] eher unwahrscheinlich. Auch in unserer Studie trifft diese Erklärung nicht zu, da eine beeinträchtigte Bindung von BCG an Albumin aufgrund der guten Korrelation zu einer immunologischen Referenzmethode unwahrscheinlich ist und eine schlechte Korrelation der BCP-Methode zu der Referenzmethode wiederum auf einen möglichen Bindungsdefekt hindeutet.

Wells et al. [136] stellten fest, dass die Unterschätzung der Albuminwerte bei Hämodialysepatienten durch die BCP-Messungen im Vergleich zur immunologischen Referenzmethode sowohl vor, als auch nach der Dialyse gleich und über 3 Monate hinweg konstant waren. Daraus kann man schließen, dass es sich bei der Störsubstanz um eine Substanz handelt, welche eine hohe Albuminbindung besitzt und durch die Dialyse nicht effektiv entfernt werden kann [136]. Dies wiederum stützt unsere These, dass es sich bei dieser Substanz um die Furonsäure CMPF handeln könnte, da sie diese beiden Eigenschaften erfüllt.

Kok et al. [50] stellten in ihrer Studie bei Hämodialysepatienten eine Überschätzung der Albuminwerte für die BCG-Methode und eine Unterschätzung für die BCP-Methode im Vergleich zu einer immunologischen Referenzmethode fest. In der Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls eine Überschätzung der Albuminwerte mittels der BCG-Methode, wohingegen die BCP-Methode eine gute Korrelation zu der immunologischen Referenzmethode zeigte. Als Ursache der Unterschätzung der Albuminwerte bei Hämodialysepatienten mittels der BCP-Methode nahmen die Autoren [50] die Carbamylierung des Albumins an.

In der Studie von Wahl et al. 2018 [130] konnte gezeigt werden, dass eine ansteigende Carbamylierung des Albumins im Rahmen einer Urämie zu einer Unterschätzung der Albuminwerte durch die BCP -Methode führte, wohingegen die immunologische Referenzmethode unbeeinflusst blieb. Im Gegensatz zur Studie von Kok et al. [50] wurde jedoch mit steigender Carbamylierung eine Unterschätzung der Albuminwerte durch die BCG-Methode festgestellt.

Die Carbamylierung könnte somit auch eine Erklärung für den negativen Bias der Albuminbestimmung durch die BCP-Methode in unserer Studie sein.

Bachmann et al. [3] stellten im Blut von Hämodialysepatienten (n= 53) eine Unterschätzung der Albuminwerte durch BCP-Methoden und eine Überschätzung der Albuminwerte durch BCG-Methoden im Vergleich zu einer immunologischen Referenzmethode fest. Hierbei fiel jedoch auf, dass die BCG-Methode im Vergleich zur BCP-Methode einen höheren Bias aufwies. Darüber hinaus stieg der Bias der BCG-Methoden proportional zu Veränderungen der Albuminlevels, wohingegen die BCP-Messungen konstant blieben. Daraus zogen die Autoren [3] den Schluss, dass die BCG-Methode anfälliger für Interaktionen mit anderen Serumproteinen ist, und empfehlen deshalb bei Hämodialysepatienten die Albuminmessung mittels BCP-Methoden. In unserer Studie wurde ebenfalls ein negativer Bias der BCP-Methode gegenüber einer immunologischen Referenzmethode festgestellt. Im Gegensatz zu der Studie von Bachmann et al. [3] korrelierte die BCG-Methode jedoch besser mit der Referenzmethode.

Carfrey et al. [10] stellten ebenfalls eine Überschätzung der Albuminwerte durch die BCG-Methode im Vergleich zu einer immunologischen Methode fest. Diese betrug bis zu 10 g/l und war besonders bei Hämodialysepatienten (n= 143) und Patienten mit Hypoalbuminämie ausgeprägt. Die BCP-Methode zeigte jedoch im Gegensatz zu unserer Studie selbst bei niedrigen Albuminlevels (< 35g/l) eine gute Korrelation zu der immunologischen Referenzmethode.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse kann man festhalten, dass für die BCP-Methoden auf der einen Seite eine hohe Präzision und eine geringere Anfälligkeit für Interaktionen mit anderen Serumproteinen und Blutbestandteilen (Globulinen, Transferrin) gegenüber der BCG-Methode beobachtet wurden [89]. Auf der anderen Seite stellten ein Großteil der Studien und unsere eigene eine Unterschätzung der Albuminwerte insbesondere bei Hämodialysepatienten durch BCP-Methoden [3, 67, 69, 136] fest. Darüber hinaus konnten Mabuchi et al. [67] einen Zusammenhang zwischen dem negativen Bias der BCP-Albuminbestimmung und der Furansäure CMPF herstellen, welches uns in dieser Studie nicht gelang.

In der nachfolgenden Tabelle sind für einen besseren Überblick die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der Störanfälligkeit der beiden photometrischen Methoden BCP und BCG dargestellt.

Legende

↑:	Überschätzung; falsch hoch gemessene Albuminwerte in Bezug auf die jeweilige Referenzmethode
↓:	Unterschätzung; falsch niedrig gemessene Albuminwerte in Bezug auf die jeweilige Referenzmethode
BCP/BCG:	Verhältnis der Albumin-Messergebnisse der Bromkresolpurpur-Methode und der Bromkresolgrün-Methode
BCP/IM:	Verhältnis der Albumin-Messergebnisse der Bromkresolpurpur-Methode und einer immunologischen Referenz-Methode
BCG/BCP:	Verhältnis der Albumin-Messergebnisse der Bromkresolgrün-Methode und der Bromkresolpurpur-Methode
BCG/IM:	Verhältnis der Albumin-Messergebnisse der Bromkresolgrün-Methode und einer immunologischen Methode
CKD:	chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease-patients)
CMPF:	3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure
gem.:	gemischt
ges.:	gesund
HD:	Hämodialyse
k.A.:	keine Angaben
KG:	Kontrollgruppe
K:	Krankenhaus
n:	Anzahl der Proben
n.b.:	nicht bekannt
rand.:	randomisiert

Quelle	BCP/BCG	BCP/IM	BCG/BCP	BCG/IM	weitere Aussagen/ Anmerkungen
[89]	präziser; weniger Interaktionen mit Globulinen und Transferrin	gute Korrelation	↑	↑	n= k.A.
[10]		gute Korrelation bei HD-Patienten	↑ (HD- Patienten)	↑ (HD- Patienten)	- 143 HD- Patienten - 49 gesunde Personen
[136]		↓ (HD-Patienten, Kinder)		↑ (HD- Patienten, Kinder)	- 100 gem. K- Patienten
[69]		↓ (CKD- Patienten) gute Korrelation bei KG			n= k.A.

[67]		↓ (HD-Patienten mit Urämie)			CMPF als großer Einflussfaktor - 22 HD- Patienten - 9 gesunde Personen
[50]		↓ (HD-Patienten) Carbamylierung als entscheidender Einflussfaktor gute Korrelation bei KG		↑ (HD- Patienten und KG)	n= k.A.
[3]	niedrigerer Bias bei HD- Patienten	↓ (KG und HD- Patienten)		↑ (KG und HD- Patienten)	- KG (n= 50) - 53 HD- Patienten
[22]				↑ (Bias bei ikterischen Patienten niedriger)	mögliche Ursache: niedrige BCG- Spezifität für Albuminbindung - 91 gem. Patienten

[24]			↑ (v.a. niedrigen Albumin- werten)		Akute-Phase- Proteine als mögliche Einflussfaktoren - 165 Laborproben (Protein- und Elektrolyt- Diagnostik
[107]				schlechte Korrelation	- 46 Patienten mit Leberzirrhose, nephrotischem Syndrom oder Paraproteinämie - 20 ges. Patienten
[132, 133]	BCG: Überschätzung der Albuminwerte bei niedrigen Albuminlevels, möglicherweise durch einen Anstieg der Globulinfraktion (alpha- und beta-) und Unterschätzung des Albuminwertes bei hohen Albuminlevels n= k.A.				
[111]	BCG: Überschätzung der Albuminwerte, insbesondere bei niedrigen Albuminlevels und in Proben mit erhöhtem Globulin wie zum Beispiel im nephrotischen Syndrom - 166 rand. Patienten				
[39]	BCG: Überschätzung der Albuminwerte in Proben mit erhöhter Konzentration an Akute-Phase-Proteinen n= k.A.				
[130]	Unterschätzung der Albuminwerte für BCP und BCG bei steigender Carbamylierung des Albumins im Rahmen einer Urämie - 100 HD-Patienten - KG (n= 100)				

[5]	Albuminmessung in heparinisiertem Plasma: - BCP: geringe Absenkung des Albuminwertes - BCG: starke Absenkung des Albuminwertes n= k.A.
[86]	Albuminmessung in heparinisiertem Plasma: - BCP: Anstieg des Albuminwertes - BCG: Absenkung des Albuminwertes n= k.A.

Tab.21 Überblick über die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der Störanfälligkeit der beiden photometrischen Methoden BCG und BCP

Es bleibt somit die Frage offen, was die Ursache für den negativen Bias der BCP-Methode bei Hämodialysepatienten ist und weshalb kein Zusammenhang zwischen dem negativen Bias der BCP-Albuminbestimmung und der Furansäure CMPF hergestellt werden konnte.

Wie eingangs bereits erwähnt, könnte die Furansäure CMPF der Grund für den negativen Bias der BCP-Methode bei der Albuminbestimmung bei Hämodialysepatienten sein. Es gelang uns im Gegensatz zu der Studie von Mabuchi et al. 1987 [67] jedoch nicht, eine Korrelation zwischen dem negativen Bias der BCP-Methode und der CMPF-Konzentrationen im Blut von Hämodialysepatienten nachzuweisen.

Wells et al. [136] konnten ebenfalls keinen direkten Einfluss der Medikation auf die BCP-Bestimmung und keinen Zusammenhang zwischen dem negativem Bias der BCP-Methode und der Medikation der Patienten feststellen. Auch Maguire et al. [69] beobachteten keinen negativen Einfluss von Medikamenten, welche häufig im Zusammenhang mit einer chronischen Niereninsuffizienz genommen werden, auf die Albuminbestimmung durch chromogene Methoden.

Ein entscheidender Einflussfaktor auf die Albuminbestimmung durch die photometrischen Methoden BCP und BCG könnte die steigende Carbamylierung des Albumins im Blut von Hämodialysepatienten sein [50, 130]. Dies könnte ein

Grund dafür sein, dass in unserer Studie zwar ein negativer Bias der BCP-Methode bei Hämodialysepatienten festgestellt, jedoch kein Zusammenhang zwischen dem negativen Bias der BCP-Albuminbestimmung und der Furansäure CMPF hergestellt werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Wahl der Albuminbestimmungsmethode bei Hämodialysepatienten einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse hat [3, 10]. Damit verbunden sind falsche Schlussfolgerungen aufgrund der unterschätzten Albuminwerte bei der Entscheidung über die Notwendigkeit einer Nahrungsergänzung [13] sowie falsche Beurteilungen der Qualität bzw. Güte der Versorgung von Hämodialysepatienten in Dialyseeinrichtungen [3, 12, 29].

Obwohl die immunologischen Methoden mit hohen finanziellen Kosten [10, 39] verbunden sind, scheinen sie im Moment die verlässlichsten Methoden [10, 29, 39, 107] für die quantitative Bestimmung eines solch wichtigen Laborwertes wie Albumin in der Therapie und Verlaufsbeurteilung [3, 12, 29] der chronischen Niereninsuffizienz und Hämodialyse zu sein. Man könnte durchaus darüber nachdenken, die CMPF-Konzentrationen in die Entscheidung über die Albuminbestimmungsmethode mit einzubeziehen. Bei hohen CMPF-Werten wäre eine immunologische Methode empfehlenswert, wohingegen bei niedrigen Werten eine BCP-Methode durchaus vertretbar wäre.

In Zukunft müssen jedoch weitere Untersuchungen über die Interaktionen zwischen Urämietoxinen und anderen Retentionssubstanzen mit den chromogenen Methoden durchgeführt werden, um eine Standardisierung der Albuminbestimmung bei Hämodialysepatienten zu erreichen.

5. Zusammenfassung

5.1. **Deutsche Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war es, die Anwendbarkeit der neuen BCP-Methode bei Hämodialysepatienten zu prüfen und den Einfluss der Furansäure CMPF auf chromogene Albuminbestimmungsmethoden zu untersuchen.

Hierzu wurde das Albumin in einer Gruppe von Dialyspatienten (n=124) und einer nicht-dialysepflichtigen Kontrollgruppe (n=101) mit den beiden chromogenen Methoden BCG und BCP und einer immunologischen Referenzmethode bestimmt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse zwischen den einzelnen Messmethoden und den beiden Gruppen miteinander verglichen. Die CMPF-Quantifizierung erfolgte mittels einer an die Methode von H. G. Wahl angelehnten und optimierten Methode.

Um den Einfluss weiterer Störsubstanzen mit hohen Albuminbindungsaffinitäten auf die Albuminbestimmung zu untersuchen, wurde in einer Versuchsreihe das Plasma eines nüchternen Probanden mit unterschiedlichen Medikamenten und CMPF in aufsteigenden Konzentrationen versetzt und anschließend das Albumin mittels der BCG-, BCP- und einer nephelometrischen Methode vor und nach der Substanzzugabe bestimmt.

Die Albuminmessungen mittels der neuen Advia Bromkresolpurpur-Methode (BCP) zeigten im Vergleich zur vorherigen Bromkresolgrün-Methode (BCG) in der Gruppe der Dialysepatienten einen negativen Bias für die Albuminwerte von bis zu 39,7%. Dieser war besonders in hypoalbuminämischen Proben ausgeprägt und verringerte sich proportional mit steigenden Albuminkonzentrationen. Im Gegensatz hierzu konnte in der Gruppe der Nicht-Dialysepatienten kein negativer Bias der BCP-Methode gegenüber der BCG-Methode nachgewiesen werden. Insbesondere in hypoalbuminämischen Proben war eine Überschätzung der Albuminwerte durch die BCP-Methode nachweisbar.

Im Vergleich zwischen der BCP-Methode und der nephelometrischen Referenz-Methode zeigte sich sowohl in der Gruppe der Dialysepatienten, als auch in der Gruppe der Nicht-Dialysepatienten ein negativer Bias für die BCP-Methode. Für die BCG-Methode war im Vergleich zur immunologischen Referenzmethode

insbesondere in hypoalbuminämischen Proben eine Überschätzung der Albuminwerte in beiden Patientengruppen nachweisbar.

In der Versuchsreihe mit CMPF-gespickten Plasmaproben konnte insbesondere in hypoalbuminämischen Proben eine falsch-negative Abweichung der Albuminwerte mit steigenden CMPF-Konzentrationen durch die BCP-Methode, nicht jedoch durch die BCG-Methode, beobachtet werden.

Bei der CMPF-Quantifizierung wurden in der Gruppe der Dialysepatienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe durchschnittlich deutlich höhere Konzentrationen an CMPF nachgewiesen.

Bei der Weiterentwicklung einer neuen Labormethode zur CMPF-Quantifizierung gelang es, deutlich geringere Volumina einzusetzen. Die Ergebnisse der Methoden-Validierung waren mit Variationskoeffizienten (Unpräzision in der Serie) zwischen 4,3 % und 12,8 % über den gesamten Messbereich und Korrelationskoeffizienten R^2 zwischen 0,9717 und 0,9990 für alle Eichkurven zufriedenstellend.

Auch wenn diese Studie keine Korrelation zwischen den Plasma-CMPF-Konzentrationen und dem negativen Bias der BCP-Methode herstellen konnte, zeigte die Versuchsreihe mit CMPF-gespickten Proben zumindest mit steigenden CMPF-Konzentrationen einen zunehmenden negativen Einfluss auf die BCP-Bestimmung. Darüber hinaus konnten Medikamente mit einer hohen Bindungsaffinität zu Albumin als Ursache für die falsch niedrig gemessenen Albuminwerte mittels der BCP-Methode bei Hämodialysepatienten weitestgehend ausgeschlossen werden.

Trotz höherer finanzieller Kosten sollten immunologische Methoden als verlässlichste Methoden für einen solch wichtigen Laborwert wie Albumin in der Therapie und Verlaufsbeurteilung der chronischen Niereninsuffizienz und Hämodialyse eingesetzt werden. In die Entscheidungsfindung über die Auswahl der geeigneten Albuminbestimmungsmethode bei Hämodialysepatienten könnte man die CMPF-Konzentrationen mit einbeziehen. So wäre bei höheren CMPF-Konzentrationen eine immunologische Methode vorzuziehen, wohingegen bei niedrigen Werten eine Messung mittels der BCG-Methode vertretbar wäre.

In Zukunft müssen jedoch weitere Untersuchungen über die Interaktionen zwischen Urämietoxinen und anderen Retentionssubstanzen mit den chromogenen Methoden durchgeführt werden, um eine Standardisierung der Albuminbestimmung bei Hämodialysepatienten zu erreichen.

5.2 Englische Zusammenfassung

The aim of this study was to examine the applicability of the new dye-binding method BCP for haemodialysis patients and to investigate the influence of CMPF dye-binding methods. Albumin was determined in a group of HD patients (n=124) and a group of non-HD patients (n=101) by the dye-binding methods BCG and BCP and an immunological reference method. The results from the different methods within the two groups were compared with each other. The CMPF quantitation was done in accordance to a published method that was optimized for this study.

The influence of other substances with high albumin binding affinity was also investigated by adding ascending concentrations of the drug of interest to plasma from a fasting proband with no medication. The albumin was then measured by the two dye-binding methods BCG and BCP and a nephelometric method.

The albumin measurements by the new BCP method showed – in comparison to the BCG method – a wrong negative deviation for the albumin values up to 39,7% in the group of haemodialysis patients. The negative deviation was highest in hypoalbuminaemic samples and decreased proportionality with increased albumin concentrations. In the group of non-HD patients there was no wrong negative deviation for the albumin values by the BCP method in comparison to the BCG method. Especially in hypoalbuminaemic samples, an overestimation of albumin values was attested. The new BCP method showed in comparison to the immunological method an underestimation of albumin values in both groups. The albumin measurements by the BCG method showed – in comparison to the immunological method – an overestimation of albumin values in both groups, which was especially marked in hypoalbuminaemic samples.

In a test series with CMPF-spiked plasma samples a wrong negative deviation of albumin values with increasing CMPF concentrations for the BCP method was

observed, but it was not observed for the BCG method. This effect was most marked in hypoalbuminaemic samples. The quantitation of CMPF showed marked higher concentration of CMPF in average in the group of haemodialysis patients in comparison to the control group.

Optimizing the originally published method for the quantitation of CMPF lead to a significant less sample volume of 100 µl and shorter analysis time. We succeeded in inserting marked lower volumes now. The results of the method validation with intra-assay CVs between 4.3 % and 12.8 % throughout the entire measuring range and coefficients of correlation R^2 between 0.9717 and 0.9990 for all of the calibration curves were satisfactorily.

Even though our study showed no significant correlation between the plasma CMPF concentration and the deviation of albumin values by the BCP method, the test series with CMPF-spiked samples showed an increasing negative influence on the BCP albumin determination with increasing CMPF concentrations. Other drugs with high albumin binding affinity could be excluded as far as tested.

Despite high financial costs, the immunological methods being the most reliable methods should be used for such a crucial laboratory value as albumin in therapy and running assessment of chronic renal insufficiency and haemodialysis. The CMPF concentration could be included in the decision making across the choice of suitable albumin determination methods for haemodialysis patients.

In future studies there should be further research into the interactions between uremic toxins and other retention substances by the dye-binding methods to achieve a standardization in the albumin determination in case of haemodialysis patients.

6. Anhang

6.1 **Abkürzungsverzeichnis**

k_A :	Bindungsaffinitätskonstante
μg :	Mikrogramm
μm :	Mikrometer
μmol :	Mikromol
Abb.:	Abbildung
AUC:	area under the curve
BCG:	Bromkresolgrün
BCP:	Bromkresolpurpur
bzw.:	beziehungsweise
ca.:	circa
CMPF:	3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure
DMSO:	Dimethylsulfoxid
EI:	Elektronenstoßionisation
ELISA:	enzyme linked immunosorbent assay
FGF21:	fibroblast growth factor
GC:	Gaschromatograph
GCMS:	Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer
HD:	Hämodialyse, bzw. haemodialysis
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ISTD:	Interner Standard (4-Acetyl-3,5dimethyl-2-pyrrolcarboxylsäure, 95%)
KAL:	Kalibrator
KOH:	Kaliumhydroxid
LOD:	limit of detection
LOQ:	limit of quantitation
m/z :	Verhältnis Masse/Ladung
Max.:	Maximum
MeOH:	Methanol
mg:	Milligramm

Min.:	Minimum
ml:	Milliliter
mmol:	Millimol
MS:	Massenspektroskopie
MW:	Mittelwert
NaCl:	Natriumchlorid, Kochsalz
nm:	Nanometer
NSAID:	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PAH:	p-Aminohippursäure
PSI:	pounds per square inch
R:	Korrelationsfaktor
R ² :	Korrelationskoeffizient
ROS:	Sauerstoffradikale
RT:	Retentionszeit
SD:	Standardabweichung
SEM:	Standardfehler des Mittelwerts
SIM:	Selected Ion Monitoring
SPE:	solid phase extraction
Tab.:	Tabelle
TSH:	Thyreoida-stimulierendes-Hormon
VK:	Variationskoeffizient
y:	Steigung der Geraden

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Quelle
Abb.1	chemische Struktur von Propyl- und Pentylfuransäure	[126] Mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Hans Günther Wahl, MBA.
Abb.2	chemische Struktur von Furanfettsäuren	[126] Mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Hans Günther Wahl, MBA.
Abb.3	Bromkresolgrün	
Abb.4	Bromkresolpurpur	
Abb.5a	Massenspektrum von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure (Analyt)	eigene Messungen
Abb.5b	Massenspektrum von 4-Acetyl-3,5-dimethyl-2-pyrrolcarbonsäure (ISTD)	eigene Messungen
Abb.6	Chromatogramm einer Patientenprobe	eigene Messungen
Abb.7	Methodenvergleich BCP und BN Pro Spec bei Dialysepatienten	eigene Messungen
Abb.8	Methodenvergleich BCG und BN Pro Spec bei Dialysepatienten	eigene Messungen
Abb.9	Methodenvergleich BCP und BCG bei Dialysepatienten	eigene Messungen

Abb.10	Abweichung der BCP bestimmten Albuminwerte in Abhängigkeit der Albuminkonzentration bei Dialysepatienten	eigene Messungen
Abb.11	Methodenvergleich BCP und BN Pro Spec bei Nicht-Dialysepatienten	eigene Messungen
Abb.12	Methodenvergleich BCG und BN Pro Spec bei Nicht-Dialysepatienten	eigene Messungen
Abb.13	Methodenvergleich BCP und BCG bei Nicht-Dialysepatienten	eigene Messungen
Abb.14	Typische Eichkurve CMPF	eigene Messungen
Abb.15	Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von CMPF auf die Albuminbestimmung	eigene Messungen
Abb.16	Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Naproxen auf die Albuminbestimmung	eigene Messungen
Abb.17	Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Furosemid auf die Albuminbestimmung	eigene Messungen
Abb.18	Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von DL-Tryptophan auf die Albuminbestimmung	eigene Messungen
Abb.19	Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Chloramphenicol auf die Albuminbestimmung	eigene Messungen
Abb.20	Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Thyroxin-Natrium auf die Albuminbestimmung	eigene Messungen
Abb.21	Vergleich BCP mit BCG: Einfluss von Phenprocoumon auf die Albuminbestimmung	eigene Messungen

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung
Tab.1	verwendete Chemikalien
Tab.2	verwendete Lösungsmittel und Säuren
Tab.3	verwendete Gase
Tab.4	verwendete Standardverbindungen
Tab.5	verwendete Medikamente
Tab.6	verwendete Hilfsmittel zur Probenaufarbeitung
Tab.7	verwendete Hilfsmittel für die GC-MS-Analyse
Tab.8	verwendete Geräte zur Probenaufarbeitung
Tab.9	verwendetes GC-MS
Tab.10	verwendete Albumin-Messgeräte
Tab.11	eingesetzte Ionen m/z von Analyt und ISTD im SIM-Modus
Tab.12	Eingesetzte Konzentrationen CMPF für die Eichkurven
Tab.13	Konzentrationen der einzelnen Kalibratoren (KAL)
Tab.14	Bindungseigenschaften der eingesetzten Substanzen an Plasmaalbumin
Tab.15	Medikamenten-Endkonzentrationen in DMSO
Tab.16	Ergebnisse der Mittelwerte Wiederfindung und relativen Standardabweichungen
Tab.17	Unpräzision der CMPF-Bestimmung im Plasma
Tab.18	Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit
Tab.19	Mittelwerte der Messwerte der Patientenproben
Tab.20	Einfluss der Albuminkonzentration auf die CMPF bedingten Unterschiede der Albuminbestimmung mittels BCG- und BCP-Methode

Tab.21	Überblick über die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der Störanfälligkeit der beiden photometrischen Methoden BCG und BCP
--------	--

6.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf (S. 73 bis 75) enthält persönliche Daten. Er ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

6.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden in Marburg waren die Damen/Herren:

Dr. Dr. med. C.C. Adarkwah-Yiadom,
Prof. Dr. med. D. K. Bartsch, Dr. med. M. Bauck, Prof. Dr. med. E. Baum, Prof.
Dr. med. A. Becker, Prof. Dr. S. Becker, R. Berger, Dr. med. S.R. Bergmann, PD
Dr. med. C. Best, Prof. Dr. med. S. Bien, OA Prof. Dr. med. C. Bliemel, apl. Prof.
Dr. med. S. Bösner, Dr. G. Bonaterra, Dr. D. Brandt,
PD Dr. B. Carl, Prof. Dr. Y. Cetin, Prof. Dr. F. Czubayko,
Prof. Dr. med. Dr. jur. R.B. Dettmeyer, Prof. Dr. med. N. Donner-Banzhoff,
apl. Prof. Dr. med. L. Eberhart, Prof. Dr. med. K. Eggert, Prof. Dr. med. R.
Eming,
Dr. B. Feuser, Prof. Dr. M. Franz, PD Dr. rer. nat. B. Fritz, Dr. K. Fröblius,
Prof. Dr. med. M. Geraedts, Prof. Dr. C. Görg, Prof. Dr. med. T.M. Gress, Prof.
Dr. med. I. Grgic, Dr. K. Grundmann,

Prof. Dr. med. M. Hertl, Prof. Dr. med. J.T. Heverhagen, Priv. Doz. Dr. med. S. Hoch, Univ.-Prof. Dr. R. Hofmann, Prof. Dr. med. K. Holzer, Prof. Dr. med. J. Hoyer,
 Dr. med. M. Jansen, Dr. A. Jerrentrup,
 Dr. med. G. Kalmus, Univ. Prof. Dr. med. Dr. phil. P.H. Kann M.A., Dr. med. M. Kerwat, Prof. Dr. C. Kill, Prof. Dr. R. Kinscherf, Prof. Dr. med. A. Kirschbaum, Univ.-Prof. Dr. med. T. Kircher, Dr. A. Klemmer, Prof. Dr. med. S. Knake, Dr. med. C. Knöppel, Dr. J.R. Knorrenschild, Dr. med. S. Köhler, Prof. Dr. med. A. König, Univ.-Prof. Dr. med. J. Kruse, Prof. Dr. med. M. Kühnert,
 Dr. med. N. Lang, PD Dr. med. A. Leonhardt, Dr. med. D. Librizzi, Prof. Dr. R. Lill, Prof. Dr. med. M. Lohoff, Prof. Dr. M. Luster,
 Prof. Dr. med. R.F. Maier, Prof. em. Dr. R. Moll,
 Univ.-Prof. Dr. med. I. Nenadić, Prof. Dr. med. A. Neubauer, apl. Prof. Dr. B. Neumüller, Prof. Dr. med. C. Nimsky,
 OA PD. Dr. med. L. Oberkircher, Prof. Dr. J. Oberwinkler, Prof. Dr. D. Oliver, Prof. Dr. A. Pagenstecher, A. Pehl, OA Priv.-Doz. Dr. med. C.D. Peterlein, Prof. Dr. T.D. Plant, PD Dr. R. Preisig-Müller,
 Prof. Dr. med. H. Renz, Dr. J.P. Reese, M.PH, Prof. Dr. med. G. Richter, Dr. B. Rost, Univ.-Prof. Dr. med. S. Ruchholtz, apl. Prof. Dr. med. D. Rüsch,
 Prof. Dr. I. Sahmland, Prof. Dr. J. Schäfer, Dr. M. Schäfer, Prof. Dr. med. B. Schieffer, J. Schneider, Prof. Dr. Schratt, Dr. med. U. Schu, Prof. Dr. med. S. Schulze, Dr. med. P. Seipelt, Univ.-Prof. Dr. med. G. Seitz, Univ.-Prof. Dr. med. W. Sekundo, Dr. S. Sevinc, PD. Dr. med. F. Sommer, Prof. Dr. B. Steiniger, Prof. Dr. med. A. Teymoortash, Prof. Dr. K. Thieme, Univ.-Prof. Dr. med. L. Timmermann,
 Prof. Dr. C.F. Vogelmeier, Prof. Dr. med. S. Vogt, Dr. med. B. Vojnar,
 Prof. Dr. med. U. Wagner, PD Dr. med. Dr. rer. nat. H.G. Wahl MBA, S. Waldmann, B. Watzer, Univ.-Prof. Dr. med. S. Weber, Prof. Dr. E. Weihe, Dr. rer. physiol. R. Westerman, PD Dr. R. Westermann, PD Dr. Th. T. Wißniowski, A. Wittig, Prof. Dr. T. Worzfeld, Prof. Dr. med. H. Wulf,
 PD Dr. med. V. Ziller

6.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Hans Günther Wahl für die freundliche Überlassung des Themas sowie die große Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren eine große Hilfe für mich.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Bernhard Watzer bedanken, der mir während meiner Arbeit im Labor stets in geduldiger und aufmunternder Art mit Rat und Tat zur Seite stand und mich dadurch sehr unterstützte.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern Ria und Hubert Portz bedanken, die mich auf meinem Weg durch das Studium und während der Erstellung der Doktorarbeit stets in liebevoller und ermunternder Weise begleitet haben. Ebenso danke ich meinem Zwillingsbruder Simon für sein offenes Ohr und seinen Zuspruch. Mit ihm war so manches Mal geteiltes Leid halbes Leid.

6.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Die Ehrenwörtliche Erklärung (S. 77 bis 78) ist nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

7. Literatur

1. (1986) Organikum, 16. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
2. Alberti F, Lucci P, Boselli E, Frega NG (2009) Identification of furan fatty acids in seafood. *Progress in Nutrition* 11(3):154–161
3. Bachmann LM, Yu M, Boyd JC, Bruns DE, Miller WG (2017) State of Harmonization of 24 Serum Albumin Measurement Procedures and Implications for Medical Decisions. *Clin Chem* 63(3):770–779
4. Batna A, Scheinkönig J, Spiteller G (1993) The occurrence of furan fatty acids in *Isochrysis* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim Biophys Acta* 1166(2-3):171–176
5. Bonvicini P, Ceriotti G, Plebani M, Volpe G (1979) Heparin interferes with albumin determination by dye-binding methods. *Clin Chem* 25(8):1459–1460
6. Braamskamp MJAM, Dolman KM, Tabbers MM (2010) Clinical practice. Protein-losing enteropathy in children. *Eur J Pediatr* 169(10):1179–1185
7. Brunet P, Dou L, Cerini C, Berland Y (2003) Protein-bound uremic retention solutes. *Adv Ren Replace Ther* 10(4):310–320
8. Caironi P, Gattinoni L (2009) The clinical use of albumin. The point of view of a specialist in intensive care. *Blood Transfus* 7(4):259–267
9. Calvo R, Carlos R, Erill S (1985) Underestimation of albumin content by bromocresol green, induced by drug displacers and uremia. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 23(2):76–78
10. Carfray A, Patel K, Whitaker P, Garrick P, Griffiths GJ, Warwick GL (2000) Albumin as an outcome measure in haemodialysis in patients. The effect of variation in assay method. *Nephrol Dial Transplant* 15(11):1819–1822
11. Chvalová D, Špička J (2016) Identification of furan fatty acids in the lipids of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Food Chem* 200:183–188
12. Clinical Performance Goals 2012-2013.
<http://www.therenalnetwork.org/qi/resources/trn-CPMgoals2012-2013e.pdf>.
Zugegriffen: 09. September 2018
13. Clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. (2000) *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 35(6, Suppl):1–141
14. Costigan MG, Lindup WE (1996) Plasma clearance in the rat of a furan dicarboxylic acid which accumulates in uremia. *Kidney Int* 49(3):634–638
15. Costigan MG, Yaqoob M, Lindup WE (1995) Effects of haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis on the plasma clearance of an albumin-bound furan dicarboxylic acid. *Nephrol Dial Transplant* 10(5):648–652
16. Costigan MG, Callaghan CA, Lindup WE (1996) Hypothesis. Is accumulation of a furan dicarboxylic acid (3-carboxy-4- methyl-5-propyl-2-furanpropanoic

- acid) related to the neurological abnormalities in patients with renal failure? *Nephron* 73(2):169–173
17. Costigan MG, Yaqoob M, Lindup WE (1996) Retention of an albumin-bound furan dicarboxylic acid in patients with chronic renal failure or after a kidney transplant. *Nephrol Dial Transplant* 11(5):803–807
 18. Dietel P, Hölzel C, Schneider K, Spiteller G (1987) Excretion of urinary acids during inverted sleep-waking rhythm. *J Chromatogr* 422:1–12
 19. Doweiko JP, Nompleggi DJ (1991) Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 15(2):207–211
 20. Englert M, Ulms K, Wendlinger C, Vetter W (2016) Isolation of a furan fatty acid from *Hevea brasiliensis* latex employing the combined use of pH-zone-refining and conventional countercurrent chromatography. *J Sep Sci* 39(3):490–495
 21. Everts ME, Lim CF, Moerings EP, Docter R, Visser TJ, Jong M de, Krenning EP, Hennemann G (1995) Effects of a furan fatty acid and indoxyl sulfate on thyroid hormone uptake in cultured anterior pituitary cells. *Am J Physiol* 268(5 Pt 1):E974–9
 22. Ferreria P, Price CP (1974) A comparison of bromocresol green and immunoprecipitation methods for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta* 55(2):259–262
 23. Fournier A, Birmelé B, François M, Prat L, Halimi J-M (2015) Factors associated with albumin loss in post-dilution hemodiafiltration and nutritional consequences. *Int J Artif Organs* 38(2):76–82
 24. Garcia Moreira V, Beridze Vaktangova N, Martinez Gago MD, Laborda Gonzalez B, Garcia Alonso S, Fernandez Rodriguez E (2018) Overestimation of Albumin Measured by Bromocresol Green vs Bromocresol Purple Method. Influence of Acute-Phase Globulins. *Lab Med* 49(4):355–361. doi:10.1093/labmed/lmy020
 25. Glass RL, Krick TP, Echardt AE (1974) New series of fatty acids in northern pike (*Esox lucius*). *Lipids* 9(12):1004–1008
 26. Glass RL, Krick TP, Sand DM, Rahn CH, Schlenk H (1975) Furanoid fatty acids from fish lipids. *Lipids* 10(11):695–702
 27. Gorst-Allman CP, Puchta V, Spiteller G (1988) Investigations of the origin of the furan fatty acids (F-acids). *Lipids* 23(11):1032–1036
 28. Grahl-Nielsen O, Glover KA (2010) Fatty acids in fish scales. *Marine Biology* 157(7):1567–1576
 29. Grangé S, Hanoy M, Le Roy F, Guerrot D, Godin M (2013) Monitoring of hemodialysis quality-of-care indicators. Why is it important? *BMC Nephrol* 14:109
 30. Gulhar R, Jialal I (2018) StatPearls. Physiology, Acute Phase Reactants, Treasure Island (FL)

31. Gunstone FD, Wijesundera RC, Scrimgeour C.M. (1978) The Component Acids of Lipids from Marine and Freshwater Species with Special Reference to Furan-containing Acids. *J. Sci. Food Agric* 29(6):539–550
32. Guth H, Grosch W (1991) Detection of furanoid fatty acids in soya-bean oil - cause for the light-induced off-flavour. *Fat Sci. Technol.* 93(7):249–255
33. Guth H, Grosch W (1992) Furan fatty acids in butter and butter oil. *European Food Research and Technology* 194(4):360–362
34. Hannemann K, Puchta V, Simon E, Ziegler H, Ziegler G, Spiteller G (1989) The common occurrence of furan fatty acids in plants. *Lipids* 24(4):296–298
35. Hasma H, Subramaniam A (1978) The occurrence of a furanoid fatty acid in *Hevea brasiliensis* latex. *Lipids* 13(12):905–907
36. Heindl A, Dietel P, Spiteller G (1986) Distinction between urinary acids originating from nutrition and those produced in the human body. *J Chromatogr* 377:3–14
37. Henderson SJ, Lindup WE (1990) Interaction of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, an inhibitor of plasma protein binding in uraemia, with human albumin. *Biochem Pharmacol* 40(11):2543–2548
38. Henderson SJ, Lindup WE (1992) Renal organic acid transport. Uptake by rat kidney slices of a furan dicarboxylic acid which inhibits plasma protein binding of acidic ligands in uremia. *J Pharmacol Exp Ther* 263(1):54–60
39. Hill PG (1985) The measurement of albumin in serum and plasma. *Ann Clin Biochem* 22 (Pt 6):565–578
40. Huang Y, Sun H, Frassetto L, Benet LZ, Lin ET (2006) Liquid chromatographic tandem mass spectrometric assay for the uremic toxin 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(10):1611–1614
41. Ishii K, Okajima H, Okada Y, Watanabe H (1988) Studies on furan fatty acids of salmon roe phospholipids. *J Biochem* 103(5):836–839
42. Ishii K, Okajima H, Koyamatsu T, Okada Y, Watanabe H (1988) The composition of furan fatty acids in the crayfish. *Lipids* 23(7):694–700
43. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Tsuruta Y, Niwa T (2012) Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal Bioanal Chem* 403(7):1841–1850
44. Itoh Y, Ezawa A, Kikuchi K, Tsuruta Y, Niwa T (2013) Correlation between Serum Levels of Protein-Bound Uremic Toxins in Hemodialysis Patients Measured by LC/MS/MS. *Mass Spectrom (Tokyo)* 2(Spec Iss):S0017
45. Jeejeebhoy KN, Samuel AM, Singh B, Nadkarni GD, Desai HG, Borkar AV, Mani LS (1969) Metabolism of albumin and fibrinogen in patients with tropical sprue. *Gastroenterology* 56(2):252–267
46. Kaysen GA, Myers BD, Couser WG, Rabkin R, Felts JM (1986) Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab Invest* 54(5):479–498

47. Kaysen GA, Rathore V, Shearer GC, Depner TA (1995) Mechanisms of hypoalbuminemia in hemodialysis patients. *Kidney Int* 48(2):510–516
48. Keyser JW, Fifield R, Watkins GL (1981) Standardization of immunochemical determinations of serum albumin. *Clin Chem* 27(5):736–738
49. Kirsch R, Frith L, Black E, Hoffenberg R (1968) Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. *Nature* 217(5128):578–579
50. Kok MB, Tegelaers FPW, van Dam B, van Rijn JLML, van Pelt J (2014) Carbamylation of albumin is a cause for discrepancies between albumin assays. *Clin Chim Acta* 434:6–10. doi:10.1016/j.cca.2014.03.035
51. Kragh-Hansen U (1990) Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan Med Bull* 37(1):57–84
52. Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR (2002) Predicting plasma protein binding of drugs. A new approach. *Biochem Pharmacol* 64(9):1355–1374
53. Lankinen MA, Hanhineva K, Kolehmainen M, Lehtonen M, Auriola S, Mykkänen H, Poutanen K, Schwab U, Uusitupa M (2015) CMPF does not associate with impaired glucose metabolism in individuals with features of metabolic syndrome. *PLoS ONE* 10(4):e0124379
54. Lichtinghagen R *Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik. Teil 2 Qualitätskontrolle Trennmethode Analytische Verfahren. Medizinische Hochschule Hannover, Klinische Chemie.* https://www.mh-hannover.de/fileadmin/institute/klinische_chemie/downloads/fh-vorlesung2.pdf. Zugegriffen: 21. März 2018
55. Liebich HM, Pickert A, Tetschner B (1984) Gas chromatographic and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of organic acids in plasma of patients with chronic renal failure. *J Chromatogr* 289:259–266
56. Liebich HM, Risler T, Fischer U, Rapp K, Tetschner B, Eggstein M (1987) Gas chromatographic determination of hippuric acid and a furancarboxylic acid in plasma of patients with kidney diseases. *J Chromatogr* 399:291–294
57. Liebich HM, Bubeck JJ, Pickert A, Wahl G, Scheiter A (1990) Hippuric acid and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in serum and urine. Analytical approaches and clinical relevance in kidney diseases. *J Chromatogr* 500:615–627
58. Liebich HM, Reichenmiller AM, Wahl HG, Tetschner B, Risler T, Eggstein M (1992) GC-MS Separation and Quantitation of 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionic Acid and Hippuric Acid from Plasma of Patients with Renal Failure. Application to Blood Purification Methods. *Journal of High Resolution Chromatography* 15:601–604
59. Lim CF, Bernard BF, Jong M de, Docter R, Krenning EP, Hennemann G (1993) A furan fatty acid and indoxyl sulfate are the putative inhibitors of

- thyroxine hepatocyte transport in uremia. *J Clin Endocrinol Metab* 76(2):318–324
60. Lim CF, Stockigt JR, Curtis AJ, Wynne KN, Barlow JW, Topliss DJ (1993) A naturally occurring furan fatty acid enhances drug inhibition of thyroxine binding in serum. *Metab Clin Exp* 42(11):1468–1474
 61. Liu Y, Prentice KJ, Eversley JA, Hu C, Batchuluun B, Leavey K, Hansen JB, Wei DW, Cox B, Dai FF, Jia W, Wheeler MB (2016) Rapid Elevation in CMPF May Act As a Tipping Point in Diabetes Development. *Cell Rep* 14(12):2889–2900
 62. Lowrie EG, Lew NL (1990) Death risk in hemodialysis patients. The predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am J Kidney Dis* 15(5):458–482
 63. Luce M, Bouchara A, Pastural M, Granjon S, Szelag JC, Laville M, Arkouche W, Fouque D, Soulage CO, Koppe L (2018) Is 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF) a Clinically Relevant Uremic Toxin in Haemodialysis Patients? *Toxins (Basel)* 10(5)
 64. Mabuchi H, Nakahashi H (1986) Isolation and characterization of an endogenous drug-binding inhibitor present in uremic serum. *Nephron* 44(4):277–281
 65. Mabuchi H, Nakahashi H (1986) Profiling of endogenous ligand solutes that bind to serum proteins in sera of patients with uremia. *Nephron* 43(2):110–116
 66. Mabuchi H, Nakahashi H (1987) Determination of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, a major endogenous ligand substance in uremic serum, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr* 415(1):110–117
 67. Mabuchi H, Nakahashi H (1987) Underestimation of serum albumin by the bromocresol purple method and a major endogenous ligand in uremia. *Clin Chim Acta* 167(1):89–96
 68. Mabuchi H, Nakahashi H (1988) Inhibition of hepatic glutathione S-transferases by a major endogenous ligand substance present in uremic serum. *Nephron* 49(4):281–283
 69. Maguire GA, Price CP (1986) Bromocresol purple method for serum albumin gives falsely low values in patients with renal insufficiency. *Clin Chim Acta* 155(1):83–87
 70. Mahbubul Alam SM, Lucky Yeasmin, Nadim Reza M, Shilpi JA, Firoj Ahmed and Jamil Akter, M. (2004) Studies on Binding Parameters of Chloramphenicol on Bovine Serum Albumin (BSA). *Journal of Biological Sciences* 4(2):203–206
 71. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VTG, Sato K, Otagiri M, Maruyama T (2012) A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular

- cells via the generation of a radical intermediate. *Biochem Pharmacol* 84(9):1207–1214
72. Morris LJ, Marshall MO, Kelly W. A unique furanoid fatty acid from *Exocarpus* seed oil *Tetrahedron Letters*, Bd 36, 4249-4253, 1966
 73. Moshage HJ, Janssen JA, Franssen JH, Hafkenscheid JC, Yap SH (1987) Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *J Clin Invest* 79(6):1635–1641
 74. Nagy E, Liu Y, Prentice KJ, Sloop KW, Sanders PE, Batchuluun B, Hammond CD, Wheeler MB, Durham TB (2017) Synthesis and Characterization of Urofuranoic Acids. In Vivo Metabolism of 2-(2-Carboxyethyl)-4-methyl-5-propylfuran-3-carboxylic Acid (CMPF) and Effects on in Vitro Insulin Secretion. *J Med Chem* 60(5):1860–1875
 75. Niwa T, Takeda N, Maeda K, Shibata M, Tatematsu A (1988) Accumulation of furancarboxylic acids in uremic serum as inhibitors of drug binding. *Clin Chim Acta* 173(2):127–138
 76. Niwa T, Yazawa T, Kodama T, Uehara Y, Maeda K, Yamada K (1990) Efficient removal of albumin-bound furancarboxylic acid, an inhibitor of erythropoiesis, by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 56(3):241–245
 77. Niwa T, Aiuchi T, Nakaya K, Emoto Y, Miyazaki T, Maeda K (1993) Inhibition of mitochondrial respiration by furancarboxylic acid accumulated in uremic serum in its albumin-bound and non-dialyzable form. *Clin Nephrol* 39(2):92–96
 78. Niwa T, Kawagishi I, Ohya N (1994) Rapid assay for furancarboxylic acid accumulated in uremic serum using high-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 226(1):89–94
 79. Niwa T, Asada H, Tsutsui S, Miyazaki T (1995) Efficient removal of albumin-bound furancarboxylic acid by protein-leaking hemodialysis. *Am J Nephrol* 15(6):463–467
 80. Niwa T (2009) Recent progress in the analysis of uremic toxins by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(25):2600–2606
 81. Niwa T (2011) Update of uremic toxin research by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 30(3):510–521
 82. Niwa T (2013) Removal of protein-bound uraemic toxins by haemodialysis. *Blood Purif* 35 Suppl 2:20–25
 83. Okajima H, Ishii K, Watanabe H (1984) Studies on lipids of crayfish, *Procambarus clarkii*. I. Furanoid fatty acids. *Chem Pharm Bull* 32(8):3281–3286
 84. Owen WF, Lew NL, Liu Y, Lowrie EG, Lazarus JM (1993) The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 329(14):1001–1006

85. Pacetti D, Alberti F, Boselli E, Frega NG (2010) Characterisation of furan fatty acids in Adriatic fish. *Food Chem* 122(1):209–215
86. Perry BW, Doumas BT (1979) Effect of heparin on albumin determination by use of Bromcresol Green and Bromcresol Purple. *Clin Chem* 25(8):1520–1522
87. Pfordt J, Spiteller G Carbonsäuren im menschlichen Blut. *Liebigs Ann. Chem.* 1980(2):175–184
88. Pfordt J, Thoma H, Spiteller G (1981) Identifizierung, Strukturabgleichung und Synthese bisher unbekannter Urofuransäuren im menschlichen Blut. *Liebigs Ann. Chem.*:2298–2308
89. Pinnell AE, Northam BE (1978) New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromcresol purple. *Clin Chem* 24(1):80–86
90. Prentice KJ, Luu L, Allister EM, Liu Y, Jun LS, Sloop KW, Hardy AB, Wei L, Jia W, Fantus IG, Sweet DH, Sweeney G, Retnakaran R, Dai FF, Wheeler MB (2014) The furan fatty acid metabolite CMPF is elevated in diabetes and induces β cell dysfunction. *Cell Metab* 19(4):653–666
91. Prentice KJ, Wendell SG, Liu Y, Eversley JA, Salvatore SR, Mohan H, Brandt SL, Adams AC, Serena Wang X, Wei D, FitzGerald GA, Durham TB, Hammond CD, Sloop KW, Skarke C, Schopfer FJ, Wheeler MB (2018) CMPF, a Metabolite Formed Upon Prescription Omega-3-Acid Ethyl Ester Supplementation, Prevents and Reverses Steatosis. *EBioMedicine* 27:200–213
92. Puchta V, Spiteller G, Weidinger H (1988) F-Säuren : Eine bisher unbekannte Komponente der Phospholipide des Humanblutes. *Liebigs Ann. Chem.* 1988(1):25–28
93. Rontani JF, Christodoulou S, Kobizek M (2005) GC-MS structural characterization of fatty acids from marine aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Lipids* 40(1):97–108
94. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS (1973) Albumin metabolism. *Gastroenterology* 64(2):324–337
95. Sakai T, Takadate A, Otagiri M (1995) Characterization of binding site of uremic toxins on human serum albumin. *Biol Pharm Bull* 18(12):1755–1761
96. Sarnatskaya VV, Lindup WE, Niwa T, Ivanov AI, Yushko LA, Tjia J, Maslenny VN, Korneeva LN, Nikolaev VG (2002) Effect of protein-bound uraemic toxins on the thermodynamic characteristics of human albumin. *Biochem Pharmacol* 63(7):1287–1296
97. Sassa T, Matsuno H, Niwa M, Kozawa O, Takeda N, Niwa T, Kumada T, Uematsu T (2000) Measurement of furancarboxylic acid, a candidate for uremic toxin, in human serum, hair, and sweat, and analysis of pharmacological actions in vitro. *Arch Toxicol* 73(12):649–654

98. Sato M, Koyama M, Miyazaki T, Niwa T (1996) Reduced renal clearance of furancarboxylic acid, a major albumin-bound organic acid, in undialyzed uremic patients. *Nephron* 74(2):419–421
99. Scheinkönig J, Spiteller G (1993) F-Säure-haltige Phospholipidmoleküle in Zuckerrohrzellen. *Liebigs Ann. Chem.* 1993(2):121–124
100. Schödel R, Spiteller G (1987) Über das Vorkommen von F-Säuren in Rinderleber und deren enzymatischen Abbau bei Gewebeverletzungen. *Liebigs Ann. Chem.*:459–462
101. Schödel R, Dietel P, Spiteller G (1986) F-Säuren als Vorstufen der Urofuransäuren. *Liebigs Ann. Chem.*:127–131
102. Shinzato T, Morita H, Maeda K (1994) Metabolism and kinetics of propylurofuranic acid in end-stage renal failure. *ASAIO J* 40(1):94–96
103. Shirasaka N, Nishi K, Shimizu S (1995) Occurrence of a furan fatty acid in marine bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1258(3):225–227
104. Siemens Healthcare Diagnostics Inc (06_2016) Bedienungsanleitung ADVIA Chemistry systems. BCG-Methode
105. Siemens Healthcare Diagnostics Inc (05_2015) Bedienungsanleitung ADVIA Chemistry XPT systems. BCP-Methode
106. Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (10_2017) Bedienungsanleitung N Antiserum gegen Human-Albumin. BN II / BN ProSpec system
107. Slater L, Carter PM, Hobbs JR (1975) Technical Bulletin No. 34. Measurement of albumin in the sera of patients. *Ann Clin Biochem* 12(1):33–40
108. Smet R de, Dhondt A, Eloit S, Galli F, Waterloos MA, Vanholder R (2007) Effect of the super-flux cellulose triacetate dialyser membrane on the removal of non-protein-bound and protein-bound uraemic solutes. *Nephrol Dial Transplant* 22(7):2006–2012
109. Spectral data from 1-Pyrrole-2-carboxylic acid, 4-acetyl-3,5-dimethyl-, methyl ester. <https://scifinder.cas.org/scifinder/login>. Zugriffen: 28. März 2018
110. Spectral data from 2-furanpropionic acid, 3-(methoxycarbonyl)-4-methyl-5-propyl-, methylester. <https://scifinder.cas.org/scifinder/login>. Zugriffen: 28. März 2018
111. Speicher CE, Widish JR, Gaudot FJ, Hepler BR (1978) An evaluation of the overestimation of serum albumin by bromocresol green. *Am J Clin Pathol* 69(3):347–350
112. Spiteller M., Spiteller G., Hoyer G.-A. (1980) Urofuransäuren - eine bisher unbekannte Klasse von Stoffwechselprodukten. *Chem Ber.* 113:699–709
113. Sun H, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ (2004) Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos* 32(11):1239–1246

114. Takamura N, Maruyama T, Otagiri M (1997) Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide. Possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clin Chem* 43(12):2274–2280
115. Tanaka T, Ikebuchi H, Sawada J, Tanaka Y (1998) Production of antiserum for sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid by chemiluminescence. *Lipids* 33(7):733–736
116. Tsuchida K, Minakuchi J (2011) Albumin loss under the use of the high-performance membrane. *Contrib Nephrol* 173:76–83
117. Tsujimoto M, Kinoshita Y, Hirata S, Otagiri M, Ohtani H, Sawada Y (2008) Effects of uremic serum and uremic toxins on hepatic uptake of digoxin. *Ther Drug Monit* 30(5):576–582
118. Tsutsumi Y, Maruyama T, Takadate A, Goto M, Matsunaga H, Otagiri M (1999) Interaction between two dicarboxylate endogenous substances, bilirubin and an uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, on human serum albumin. *Pharm Res* 16(6):916–923
119. Tsutsumi Y, Maruyama T, Takadate A, Shimada H, Otagiri M (2000) Decreased bilirubin-binding capacity in uremic serum caused by an accumulation of furan dicarboxylic acid. *Nephron* 85(1):60–64
120. Vanholder R, Smet R de, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, Deyn PP de, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W (2003) Review on uremic toxins. Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 63(5):1934–1943
121. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J (2008) A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 19(5):863–870
122. Vanholder R, van Laecke S, Glorieux G (2008) What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol* 23(8):1211–1221
123. Vanholder R, Pletinck A, Schepers E, Glorieux G (2018) Biochemical and Clinical Impact of Organic Uremic Retention Solutes. A Comprehensive Update. *Toxins (Basel)* 10(1)
124. Vorum H, Honoré B (1996) Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. *J Pharm Pharmacol* 48(8):870–875
125. Wahl HG (1994) Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen zum Vorkommen von Furansäuren. Identifizierung von Furanfettsäuren in Fischöl und Quantifizierung von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionsäure im Serum und Urin hyperlipämischer Patienten unter Fischölbehandlung. Dissertationsschrift, Eberhard-Karls-Universität

126. Wahl HG (1998) Das renale Ausscheidungsverhalten von Furansäuren. Der Einfluss von oral appliziertem Probenecid und Pyrazinamid. Dissertationsschrift, Eberhard-Karls-Universität
127. Wahl HG, Tetschner B, Liebich HM (1992) The effect of dietary fish oil supplementation on the concentration of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in human blood and urine. *Journal of High Resolution Chromatography* 15:815–818
128. Wahl HG, Chrzanowski A, Liebich HM, Hoffmann A. (1994) Identification of furan fatty acids in nutritional oils and fats by multi-dimensional GC-MSD. *AppNote* 6
129. Wahl HG, Chrzanowski A, Müller C., Liebich HM, Hoffmann A. (1995) Identification of furan fatty acids in human blood cells and plasma by multi-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 697:453–459
130. Wahl HG, Portz S, Moennikes R, Renz H (2018) Underestimation of albumin in haemodialysis patients by both carbamylated albumin and the uremic toxin 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid (CMPF). *Nephrology, dialysis, transplantation* 33:269
131. Wakimoto T, Kondo H, Nii H, Kimura K, Egami Y, Oka Y, Yoshida M, Kida E, Ye Y, Akahoshi S, Asakawa T, Matsumura K, Ishida H, Nukaya H, Tsuji K, Kan T, Abe I (2011) Furan fatty acid as an anti-inflammatory component from the green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(42):17533–17537
132. Webster D (1974) A study of the interaction of bromocresol green with isolated serum globulin fractions. *Clin Chim Acta* 53(1):109–115
133. Webster D, Bignell AH, Attwood EC (1974) An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta* 53(1):101–108
134. Weil MH, Henning RJ, Puri VK (1979) Colloid oncotic pressure. Clinical significance. *Crit Care Med* 7(3):113–116
135. Wellmitz J, Gluschke M (2005) Leitlinie zur Methodenvvalidierung. Texte 01/05.
<https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/2832.pdf>. Zugriffen: 01. Mai 2019
136. Wells FE, Addison GM, Postlethwaite RJ (1985) Albumin analysis in serum of haemodialysis patients. Discrepancies between bromocresol purple, bromocresol green and electroimmunoassay. *Ann Clin Biochem* 22 (Pt 3):304–309
137. Wendlinger C, Vetter W (2014) High concentrations of furan fatty acids in organic butter samples from the German market. *J Agric Food Chem* 62(34):8740–8744

138. Xu L, Sinclair AJ, Faiza M, Li D, Han X, Yin H, Wang Y (2017) Furan fatty acids - Beneficial or harmful to health? *Prog Lipid Res* 68:119–137
139. Yi J, Jin H, Zhang R, Zhang S, Chen P, Yu X, Zhang X (2017) Increased serum 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) levels are associated with glucose metabolism in Chinese pregnant women. *J Endocrinol Invest*
140. Zhang S, Chen P, Jin H, Yi J, Xie X, Yang M, Gao T, Yang L, Hu C, Zhang X, Yu X (2017) Circulating 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) levels are associated with hyperglycemia and β cell dysfunction in a Chinese population. *Sci Rep* 7(1):3114